

Proteomanalyse eines Mausmodells für die Alzheimer-Krankheit: Frühe Beeinträchtigung der hippocampalen Plastizität

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Diplom-Biologin Daniela Hartl

(02.06.1980, Gräfelfing)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Harald Saumweber

2. Prof. Dr. Dr. Joachim Klose

3. Prof. Dr. Hanspeter Herzel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2009

Zusammenfassung

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht das APP23-Mausmodell für die Alzheimer-Krankheit (AK), das eine mutierte Form des menschlichen Amyloiden Precursor Proteins (APP) exprimiert. Mit Methoden der Proteomanalyse (zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie) wurden, beginnend mit einem Embryonalstadium die primär von der AK betroffenen Gehirnregionen Hippocampus und Cortex verschiedener Altersstadien der APP23-Mäuse untersucht und somit erstmals eine Art „Proteom-Lebensprofil“ eines Mausmodells für die AK erstellt.

Bei dem Vergleich der APP23-Mäuse mit Wildtypmäusen konnte *innerhalb* aller untersuchten Altersstadien und Gehirnregionen eine große Anzahl quantitativer Proteinexpressionsunterschiede festgestellt werden. Interessanterweise bestand jedoch im Hippocampus adoleszenter, zwei Monate alter Mäuse, ein herausragend großer Unterschied. Ein Vergleich der Proteomzusammensetzung *zwischen* den verschiedenen Altersstadien zeigte, dass bei Wildtypmäusen viele entwicklungsbedingte Proteomveränderungen auftraten. Diese waren jedoch im Hippocampus der adoleszenten APP23-Mäuse, nicht aber in den anderen Altersstadien sowie im Cortex der APP23-Mäuse, ausgeblieben. Zusammen mit der Beobachtung, dass viele synaptische Proteine im Hippocampus adoleszenter APP23-Mäuse herunterreguliert waren, weisen die gewonnenen Daten darauf hin, dass ein natürlicher Peak in der hippocampalen Plastizität während der Adoleszenzphase, die sich durch eine besonders hohe neuronale Plastizität auszeichnet, in den APP23-Mäusen ausgeblieben war.

Es ist weiterhin bekannt, dass APP als morphoregulatorisches Protein auch eine wichtige Rolle in der Neurogenese spielt. Da über diese Prozesse noch wenig bekannt ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine grundlegende Untersuchung der Proteomveränderung, die im Verlauf der murinen embryonalen Gehirnentwicklung auftreten, durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass innerhalb eines Zeitraums von zwei Entwicklungstagen die Anzahl und Menge an quantitativ veränderten Proteinen konstant ist. Dies könnte die maximal mögliche Veränderungsrate widerspiegeln, die wiederum einen begrenzenden Faktor für die Geschwindigkeit der Embryonalentwicklung darstellt. Weiterhin stieg im Zuge der Neurogenese die Konzentration zelltypspezifischer Proteine an während im Gegenzug unspezifische Proteine quantitativ herunterreguliert wurden. Diese Daten könnten in Zukunft als Basis für die Untersuchung der Neurogenese bei APP23-Mäusen dienen. Interessanterweise konnten die gewonnenen Erkenntnisse durch eine Transkriptomstudie reproduziert und ergänzt werden.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass es von großer Wichtigkeit ist, die AK bereits weit vor dem phänotypischen Auftreten von Merkmalen zu untersuchen. Mit Hilfe der Proteomstudie konnten nicht nur Proteine identifiziert werden, die in den Krankheitsverlauf involviert sind, sondern auch grundlegende Mechanismen entdeckt werden, die möglicherweise zu der Entwicklung der AK führen oder die embryonale Neurogenese regulieren.

Schlagwörter: Alzheimer-Krankheit, APP23-Mausmodell, Plastizität, Proteom

Abstract

The work presented here focuses on the analysis of the APP23 mouse model for Alzheimer's disease (AK). This model expresses a mutant form of the human amyloid precursor protein (APP). Using a 2-DE based proteomics approach; the two primarily affected brain regions in AD, cortex and hippocampus, were analyzed in APP23 and control mice at different ages. Thus, for the first time, a lifetime profile of brain proteome alterations caused by mutant APP expression was created.

Protein expression alterations between APP23 and control mice were numerous at all age stages but unexpectedly, the hippocampus of two-month old (adolescent) mice, showed a dramatic peak in the number of altered proteins. When comparing proteome patterns longitudinally between age stages, a large number of proteins were altered in wildtype mice between age stages. Interestingly, these alterations were largely absent in the hippocampus of adolescent APP23-mice but not in other stages compared. Apparently, the large difference in hippocampal protein pattern changes between two-month old APP23- and wildtype-mice was caused by an absence of distinct developmental changes in APP23-mice. In summary, the absence of longitudinal developmental proteome alterations during adolescence, a developmental stage where neuronal plasticity is prominent and horizontal (disease/control) down-regulation of many proteins related to plasticity suggests the disruption of a normally occurring peak of hippocampal plasticity during adolescence of APP23-mice.

APP, a neuron-morphoregulatory protein was also suggested to play an important role in embryonic and adult neurogenesis. Since information about the molecular mechanisms of neurogenesis is scarce, a basic analysis of protein changes during normal embryonic neurogenesis was conducted. Interestingly, the rate of protein concentration change within two days of development was constant. This might represent the maximal rate limiting the speed of embryonic development. During neurogenesis, cell-type specific proteins were up- and unspecific proteins down-regulated. Proteins changed during neurogenesis might be of special importance for a future analysis of neurogenesis in APP23-mice. Furthermore, developmental protein alterations were reproduced in a transcriptome study.

In summary, this study shows that it is of utmost importance to investigate AK even at an early age prior to the occurrence of disease symptoms. Using a proteomics approach, a dysregulation of adolescent brain plasticity potentially responsible for the development of AK was detected. Future studies will show if neurogenesis is also disturbed in APP23-mice embryogenesis.

Keywords: Alzheimer's disease, mouse model APP23, plasticity, proteome

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	2
Abstract.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Die Alzheimer-Krankheit.....	8
1.1.1 Geschichte.....	8
1.1.2 Pathologie	8
1.1.3 Genetik.....	11
1.2 Das Amyloide Precursor Protein	12
1.2.1 Evolution und Struktur.....	12
1.2.2 Prozessierung.....	13
1.2.3 Zelluläre Funktionen.....	16
1.3 Die Neurogenese	17
1.3.1 Phasen der embryonalen Gehirnentwicklung.....	17
1.3.2 Molekulare Mechanismen der embryonalen Neurogenese	21
1.3.3 Adulte Neurogenese.....	22
1.3.4 Rolle des Amyloiden Precursor Proteins in der Neurogenese.....	23
1.4 Das APP23-Mausmodell für die Alzheimer-Krankheit	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte und Zubehör	26
2.1.2 Verbrauchsmaterial	27
2.1.3 Chemikalien.....	29
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	33
2.1.5 Antikörper.....	36
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Versuchstiere und Gewebepräparation.....	38
2.2.2 Proteinextraktion.....	39

2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
2.2.4	Großgel 2D-Elektrophorese	41
2.2.5	Silberfärbung von 2-D-Gelen	47
2.2.6	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen (<i>Saturation labelling</i>).....	48
2.2.7	2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE).....	48
2.2.8	Auswertung der Proteinmuster	50
2.2.9	Identifizierung der Proteinspots durch die Massenspektrometrie	54
2.2.10	Immunoblotting	57
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Untersuchung des APP23-Mausmodells für die Alzheimer-Krankheit.....	59
3.1.1	Vergleich der Proteinmuster von APP23- und Wildtypmäusen.....	60
3.1.2	Analyse entwicklungsbedingter Proteomveränderungen	64
3.1.3	Identifizierung und Einteilung der varianten Proteine	67
3.2	Untersuchung der embryonalen Gehirnentwicklung	78
3.2.1	Vergleich der Proteomkomplexität.....	79
3.2.2	Analyse entwicklungsbedingter Proteomveränderungen	80
3.2.3	Identifizierung und Einteilung der varianten Proteine	83
4	Diskussion	92
4.1	Proteomveränderungen im Gehirn der APP23-Mäuse.....	92
4.1.1	Auffälliger Peak im hippocampalen Proteomprofil zwei Monate alter APP23-Mäuse.....	92
4.1.2	Herunterregulation plastizitätsassoziierter Proteine im Hippocampus adoleszenter APP23-Mäuse	93
4.1.3	Beeinträchtigung der adoleszenten hippocampalen Plastizität	96
4.1.4	Verdünnung des Effektes im Cortex der APP23-Mäuse	98
4.1.5	Das Embryonalstadium ET16: frühe Herunterregulation von Proteasomproteinen.....	98
4.1.6	In mehreren Stadien veränderte Proteine: potentielle APP-Interaktionspartner.....	99
4.1.7	Relevanz der Resultate für die Alzheimer-Krankheit des Menschen	101
4.2	Proteomveränderungen im Verlauf der embryonalen Neurogenese.....	101
4.2.1	Proteomveränderungen als begrenzender Faktor für die Geschwindigkeit der Entwicklung ...	102
4.2.2	Übereinstimmung der Proteom- und Transkriptomdaten.....	103
4.2.3	Zelltypspezifische Modifikation des Proteoms	103
4.2.4	Schlüsselproteine für die Neurogenese	104

4.3 Zusammenfassung und Ausblick	107
Literaturverzeichnis	109
Anhang.....	120
Danksagung.....	199
Eidesstattliche Erklärung	202

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid-beta-Peptid
AICD	APP intracellular domain
AK	Alzheimer-Krankheit
Apo-E	Apolipoprotein E
APP	Amyloides Precursor Protein
C	Cortex
2-D	zweidimensional
2-DE	Großgel 2-D-Elektrophorese
DIGE	2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis
ET16	Embryonalstadium an Tag 16 post coitum
GO	Gene Ontology
H	Hippocampus
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
NFT	Neurofibrilläre Ablagerungen (neurofibrillary tangles)
NICD	Notch intracellular domain
p.c.	Post coitum
sAPP α	Soluble APP alpha
sAPP β	Soluble APP beta
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Geschichte

Demenzerkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheiten in den Industrieländern. Schätzungen gehen von aktuell circa einer Million Demenzkranken in Deutschland aus [1]. Laut internationaler Klassifikation (ICD-10-Code F00-F03) ist die Demenz ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns die sich als Störung höherer kortikaler Funktionen, wie Gedächtnis, Denken, Orientierung, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen äußert [2]. Eine Untergruppe der Demenzerkrankungen bilden die neurodegenerativen Erkrankungen, deren Hauptmerkmal der fortschreitende Verlust von Nervenzellen ist. Die Alzheimer-Krankheit (AK) ist ein Beispiel für eine neurodegenerative Krankheit und sie ist die mit zwei Dritteln aller Fälle häufigste und damit wichtigste Form der Demenz.

Die Alzheimer-Krankheit wurde 1906 erstmals von Alois Alzheimer beschrieben. Er brachte dabei die mentale Dysfunktion seiner Patientin *Auguste Deter* mit dem Vorhandensein bestimmter Proteinaggregate in ihrem Gehirn, den amyloiden Plaques und neurofibrillären Ablagerungen (NFT), in einen kausalen Zusammenhang [3]. Erst 77 Jahre nach der Entdeckung der AK wurde die Hauptkomponente der extrazellulären amyloiden Plaques, ein 40 bis 42 Aminosäuren langes Peptid namens Amyloid-beta (A β), identifiziert [4]. Kurz darauf wurde entdeckt, dass A β aus einem Vorläuferprotein, dem *Amyloiden Precursor Protein* (APP) entsteht [5]. Auch die Hauptkomponente der neurofibrillären Ablagerungen, die auch als neurofibrilläre Bündel (englisch „neurofibrillary tangles“) bezeichnet werden, wurde identifiziert. Es handelt sich hierbei um hyperphosphorylierte *Tau-Proteine* [6].

1.1.2 Pathologie

Die amyloiden Plaques, die NFT und das Absterben von Neuronen stellen die drei pathologischen Hauptmerkmale der AK dar. Allerdings sind nicht alle Gehirnareale gleichermaßen betroffen [7]. NFT treten beispielsweise bei Beginn der phänotypischen Erkrankung in hoher Dichte in der Schicht 2 (äußere Körnerzellschicht) des entorhinalen Cortex, im *Subiculum* sowie in der CA1-Region des Hippocampus auf. Dagegen sind benachbarte Gehirnregionen wie das *Prä-* und das *Parasubiculum* oder der *Gyrus dentatus* nahezu frei von neurofibrillären Ablagerungen. Auch andere Bereiche des limbischen Systems wie der *Nucleus olfactorius anterior*, die Amygdala und der *Nucleus basalis* sind erst im späteren Verlauf der Krankheit betroffen.

Das Auftreten der NFT nimmt seinen Anfang in den erwähnten Bereichen und weitet sich später auf weitere Bereiche des Gehirns aus. Diese schrittweise Ausbreitung der NFT korreliert signifikant mit der Stärke der Demenz. Im Zuge der Ausbreitung sind nach und nach mehr Cortexareale betroffen. Dabei zeigt sich auch hier eine Hierarchie der Vulnerabilität. Zunächst sind Assoziationsareale betroffen, danach breiten sich die NFT auf sensorische und motorische Areale aus. Dieses Ausbreitungsmuster folgt in umgekehrter Reihenfolge der Richtung der corticalen Informationsintegration. Nur der olfaktorische Cortex bildet eine Ausnahme, er ist bereits früh betroffen, obwohl er hierarchisch gesehen unter den Assoziationscortices steht. Anhand des Ausbreitungsmusters der NFT haben Braak und Braak die AK in sechs Stufen (Braak Stadien I bis VI, siehe Abbildung 1) unterteilt [8].

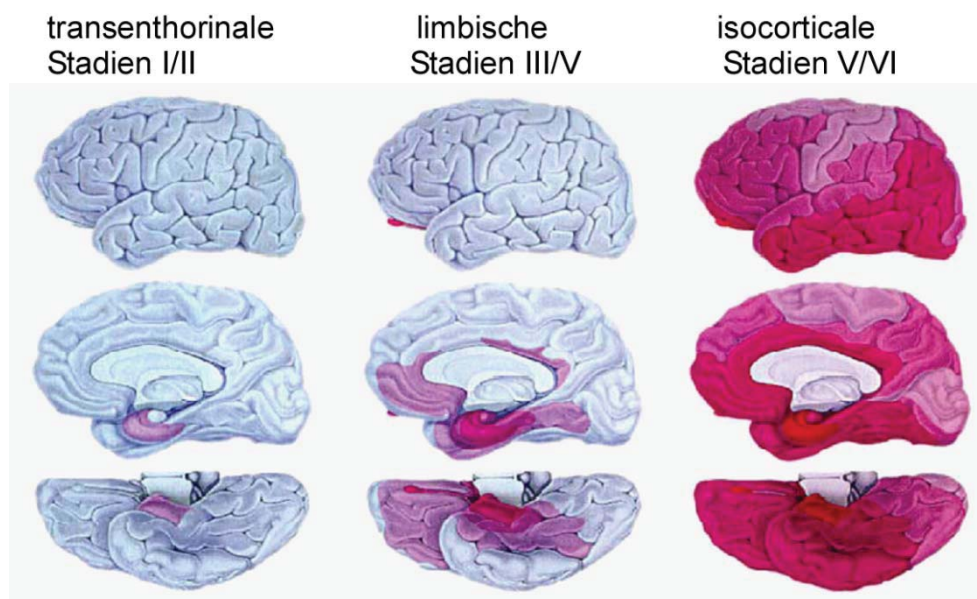


Abbildung 1: Ausbreitung der neurofibrillären Ablagerungen (rötliche Färbung) innerhalb der Braak-Stadien I bis VI. In der frühen Phase der AK (Braak-Stadien I und II) ist der entorhinale Cortex betroffen. Später (Braak-Stadien III und IV) breiten sich die NFT über das limbische System und schließlich über den gesamten Cortex aus (Braak-Stadien V und VI; modifiziert nach [7]).

Eine Hierarchie der Vulnerabilität ist weiterhin auch innerhalb der corticalen Neuronentypen erkennbar. NFT treten bevorzugt in großen Pyramidenzellen der Schichten drei (äußere Pyramidenzellschicht) und fünf (innere Pyramidenzellschicht) des Cortex auf [7].

Im Gegensatz zu den NFT sind die amyloiden Plaques, die ebenfalls ein Hauptmerkmal der AK darstellen, etwas gleichmäßiger verteilt und ihr Auftreten korreliert nicht mit der Stärke der Demenz. Jedoch sind auch sie vorrangig in Assoziationsarealen des Cortex zu finden [7]. Ein drittes Merkmal der AK ist der Verlust von Neuronen. Er folgt im Wesentlichen dem Muster der neurofibrillären Degeneration und ist demnach zunächst in der Hippocampusformation und Assoziationsregionen des Cortex zu finden [7]. Auch in subkortikalen

Gehirnregionen kann es im Laufe der AK zur Bildung von NFT und amyloiden Plaques oder zum Absterben von Neuronen kommen. Allerdings sind auch hier primär Regionen betroffen, die strukturell und funktionell eng mit den betroffenen Cortexarealen in Verbindung stehen [7].

Hinsichtlich der betroffenen Gehirnregionen fällt auf, dass diejenigen Regionen, die sich erst relativ spät in der phylogenetischen Entwicklung ausbilden oder erst spät reorganisiert werden, am anfälligsten gegenüber der Ausbildung von Symptomen der AK sind [7]. Diese Regionen reifen auch während der ontogenetischen Entwicklung am spätesten aus. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte Umweltbedingungen (z.B. das Leben in einer sozial schwachen oder reizarmen Umgebung) während der Kindes- und Jugendzeit, in der die erwähnten Gehirnregionen ausreifen, positiv mit dem Risiko für die Ausbildung einer AK korreliert sind [9]. Weiterhin weisen die gegenüber der AK empfindlichsten Gehirnregionen das höchste Ausmaß an neuronaler Plastizität auf ([7], Abbildung 2).

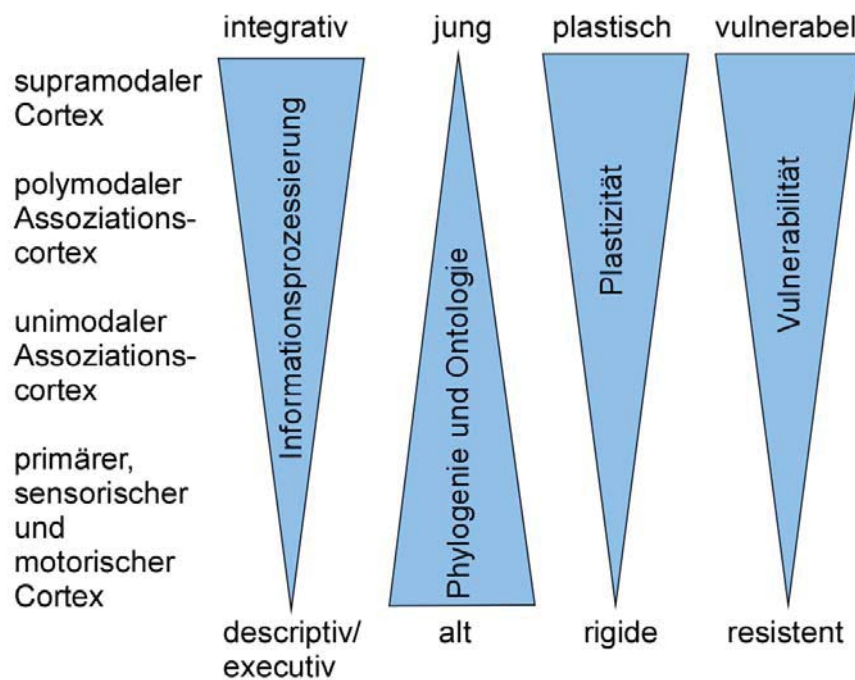


Abbildung 2: Eigenschaften verschiedener Cortexareale. Das Ausmaß der Vulnerabilität verschiedener Cortexareale gegenüber Symptomen der AK korreliert mit dem Ausmaß an Plastizität sowie der Hierarchie der Informationsintegration. Eine negative Korrelation besteht mit dem phylogenetischen und ontologischen Alter der Gehirnareale (modifiziert nach [7]).

Zu erwähnen bleibt, dass sowohl amyloide Plaques als auch NFT wiederholt auch im Gehirn älterer Personen gefunden wurden, bei denen keine Anzeichen von Demenz erkennbar waren [10]. Weiterhin können beide Merkmale auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten auftreten. Die neurofibrillären und amyloiden

Ablagerungen stellen daher eher eine Art Reaktion des Nervengewebes auf die primäre Pathologie der AK dar. Neuere Studien zeigten, dass nicht die Ausbildung von Proteinablagerungen sondern die Dysfunktion und das Absterben von Synapsen das strukturelle Hauptkorrelat der kognitiven Dysfunktion bilden [11,12]. Allerdings sind auch hier primär die schon erwähnten Gehirnregionen betroffen.

1.1.3 Genetik

Auf molekularer Ebene wurden nach dem Bekanntwerden der den Ablagerungen zugrunde liegenden Proteine, zwei Hypothesen über die Entstehung der AK formuliert: die Tau-Hypothese und die Amyloidhypothese. Die Verfechter der Tau-Hypothese sahen den Grund des Zelluntergangs in der Hyperphosphorylierung des *Tau-Proteins*, das dadurch seine Funktion im Zytoskelett nicht mehr erfüllen kann. Es sind Mutationen des Tau-Proteins bekannt, die zu der Ausbildung neurofibrillärer Ablagerungen führen, allerdings kommt es hier nicht zur Ausprägung der AK [13]. Aus diesem Grunde wurde angenommen, dass *Tau* kein zentrales Schlüsselprotein bei der Entstehung der AK darstellt.

Die heute mehrheitlich akzeptierte Amyloidhypothese besagt, dass ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau von A β , das zu einer erhöhten A β -Konzentration im Gehirn führt, die Ursache der AK ist [14,15]. Diese Hypothese wurde gestützt als genetische Studien zeigten, dass alle Fälle der seltenen, dominant vererbten (familiären) AK auf eine erhöhte A β -Produktion in Folge von APP-Mutationen oder Mutationen in den an der Prozessierung von APP beteiligten Enzymen *Präsenilin-1* und *Präsenilin-2* zurückzuführen sind. Auch eine lebenslange Überexpression von APP, die aus der Duplikation des APP-Locus herrührt sowie die Triplikation des Chromosoms 21 (Trisomie-21), auf dem das APP-Gen lokalisiert ist, resultieren in einer erhöhten A β -Produktion und sind in den meisten Fällen mit der Ausprägung der AK verbunden [16,17]. Die genetisch bedingte, familiäre AK bildet jedoch nur einen kleinen Teil von geschätzten fünf bis zehn Prozent aller Alzheimer-Demenzen [1]. Dabei weist eine sehr kleine Untergruppe von etwa einem bis drei Prozent der Patienten eine Mutation des APP-Gens auf Chromosom 21 auf. Häufiger (etwa zu 70%) sind Mutationen des Präsenilin-1-Gens auf Chromosom 14. Nur wenige Familien weisen eine Mutation des *Präsenilin-2*-Gens auf Chromosom 1 auf.

Über 90% der AK-Patienten leiden an der so genannten sporadischen AK. Ein wichtiges Kriterium, das die sporadische von der familiären Formen der AK unterscheidet, ist der Zeitpunkt der Ausprägung von Symptomen. Patienten mit familiärer AK erkranken bereits vor dem Erreichen des 65. Lebensjahres, wohingegen Patienten mit einer sporadischen AK meist erst nach dem 65. Lebensjahr erkranken [18]. Die genauen Ursachen der sporadischen AK sind noch weitgehend ungeklärt. Es scheinen jedoch eine Reihe von Risikofaktoren zu existieren. Der Hauptrisikofaktor ist das Alter, daneben sind leichte kognitive Störungen sowie eine geringe Reservekapazität des Gehirns als Beispiele für Risikofaktoren zu nennen. Die Reservekapazität des Gehirns wird dabei durch die Anzahl der Neurone und deren synaptische und dendritische Verzweigungsmuster, gepaart mit lebensstilabhängigen kognitiven Strategien bestimmt [18]. Weiterhin konnten auf genetischer Ebene inzwischen über 30 Genloci identifiziert werden, die möglicherweise mit einem erhöhten AK-Risiko in Verbindung stehen.

Die am besten beschriebene genetische Prädisposition ist ein genetischer Polymorphismus in dem Gen für das *Apolipoprotein-E* (Apo-E). Dieses hauptsächlich für den Cholesterin-Transport zuständige Protein existiert bei Menschen in den drei Isoformen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Der Hauptteil der Bevölkerung trägt die Isoform $\epsilon 3$. Die seltenere Expression der Isoform $\epsilon 4$ ist mit einem verstärkten Alzheimer-Risiko assoziiert. Die genaue Ursache hierfür ist bisher unklar. Allerdings ist bekannt, dass Apo-E mit APP und seinem Spaltprodukt A β interagiert [19].

1.2 Das Amyloide Precursor Protein

1.2.1 Evolution und Struktur

APP ist Teil einer evolutionär konservierten Familie, die in Säugetieren die Proteine APP, *APP-like protein 1* (APLP1) und *APP-like protein 2* (APLP2) umfasst. Mit Hilfe von Abstammungsanalysen wurde gezeigt, dass sich im Laufe der Evolution durch Genduplikationen zunächst APLP1 von einem gemeinsamen Vorfahren abgespalte und später (vor circa 550 Millionen Jahren) APP und APLP2 segregierten [20]. Im Gegensatz zu Vertebraten, die mehrere Paraloge besitzen, kommt im Genom von Invertebraten immer nur ein Familienmitglied vor, wie beispielsweise das *Amyloid precursor-like 1 protein* (APL-1) bei *Caenorhabditis elegans*.

Die zellulären Funktionen der APP-Familienmitglieder wurden durch die systematische Erzeugung von Mäusen, denen die Gene für einzelne oder mehrere Mitglieder der APP-Familie fehlten, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Tiere denen die Gene für APP und APLP2 sowie Tiere, denen die Gene aller drei APP-Familienmitglieder fehlten, kurz nach der Geburt starben. Tiere denen nur eines der drei Gene oder die Gene für APP und APLP1 fehlten überlebten und waren fertil. Dies zeigt eine große funktionelle Redundanz zwischen den evolutionär näher verwandten Proteinen APP und APLP2. Ausserdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Proteine der APP-Familie bereits eine wichtige Rolle in der Embryonal- und Postembryonalentwicklung sowie im normalen Zellmetabolismus spielen [21]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die zwischen den Mitgliedern der APP-Familie konservierten funktionellen Bereiche hauptsächlich Adhäsionsfunktionen besitzen, deren Spezifität durch evolutionär nicht konservierte Bereiche der entsprechenden Gene bestimmt wird [22].

Die Expression von APP ist nicht auf das Gehirn beschränkt, APP ist ein ubiquitär exprimiertes Protein. Es existiert in drei Isoformen, deren Verhältnis zueinander zelltypspezifisch ist. Durch alternatives Splicing der prä-mRNA entstehen die 770, 751 oder 695 Aminosäuren langen Isoformen. Im Gehirn werden die drei APP-Isoformen im Verhältnis 770 zu 751 zu 695 von 1 zu 10 zu 20 generiert [23].

Alle Mitglieder der APP-Familie sind Typ-1-Transmembranproteine. Das sind Proteine, die die Zellmembran nur einmal durchqueren und einen extrazellulären N-Terminus besitzen [24]. Die APP-Familie besitzt dabei eine relativ große extrazelluläre sowie eine kurze zytoplasmatische Domäne.

Die extrazelluläre APP-Sequenz kann ihrerseits in mehrere Domänen aufgeteilt werden. Beginnend vom N-Terminus an sind dies die Domänen *Heparin Binding Domain1* (HBD1) und *Copper-Binding Domain* (CuBD) die auch als E1-Domäne zusammengefasst werden. Darauf folgt eine variable, saure Region, an die die *Kunitz-type Protease Inhibitory Domain* (KPI, nur bei APP₇₇₀ und APP₇₅₁), die OX-2 Domain (nur bei APP₇₇₀) sowie die *Heparin Binding Domain1* (HBD2), die auch als E2-Domäne bezeichnet wird, anschliessen. Auf die HBD2 folgen eine Linker-Region, die *Transmembrane Domain* (TM) und schliesslich die *APP-Intracellular Domain* (AICD) [25,26].

1.2.2 Prozessierung

In der Zelle liegt APP nicht nur in seiner ungeschnittenen Form vor, sondern wird auf zwei Hauptwegen prozessiert (Abbildung 3):

Im so genannten α -Sekretase-Weg wird APP zunächst von α -Sekretasen der ADAM-Proteinfamilie (*A disintegrin and metalloprotease domain*, ADAM) innerhalb der A β -Domäne geschnitten. Hierbei entsteht das lösliche, extrazelluläre APP-Fragment sAPP α . Das verbleibende C-terminale Fragment wird von der γ -Sekretase, einem Proteinkomplex, der unter anderem auch aus den Proteinen *Präsenilin-1* und *Präsenilin-2* besteht, geschnitten, wodurch das kurze Peptid P3 sowie die intrazelluläre APP-Domäne, AICD, freigesetzt werden. Der α -Sekretase-Weg wird auch als nicht-amyloidogener Weg der APP-Prozessierung bezeichnet, da hier kein A β entsteht.

Das A β -Peptid entsteht nur auf dem zweiten Weg der APP-Prozessierung, dem β -Sekretase-Weg, der daher auch als amyloidogener Weg der APP-Prozessierung bezeichnet wird. Hierbei wird APP von einer β -Sekretase (*β -site of APP cleaving enzyme*, BACE1) vor der A β -Domäne geschnitten, was zur Freisetzung des löslichen APP-Fragments sAPP β führt. Das verbleibende Fragment wird von der γ -Sekretase geschnitten. Dabei entstehen die Fragmente A β und AICD.

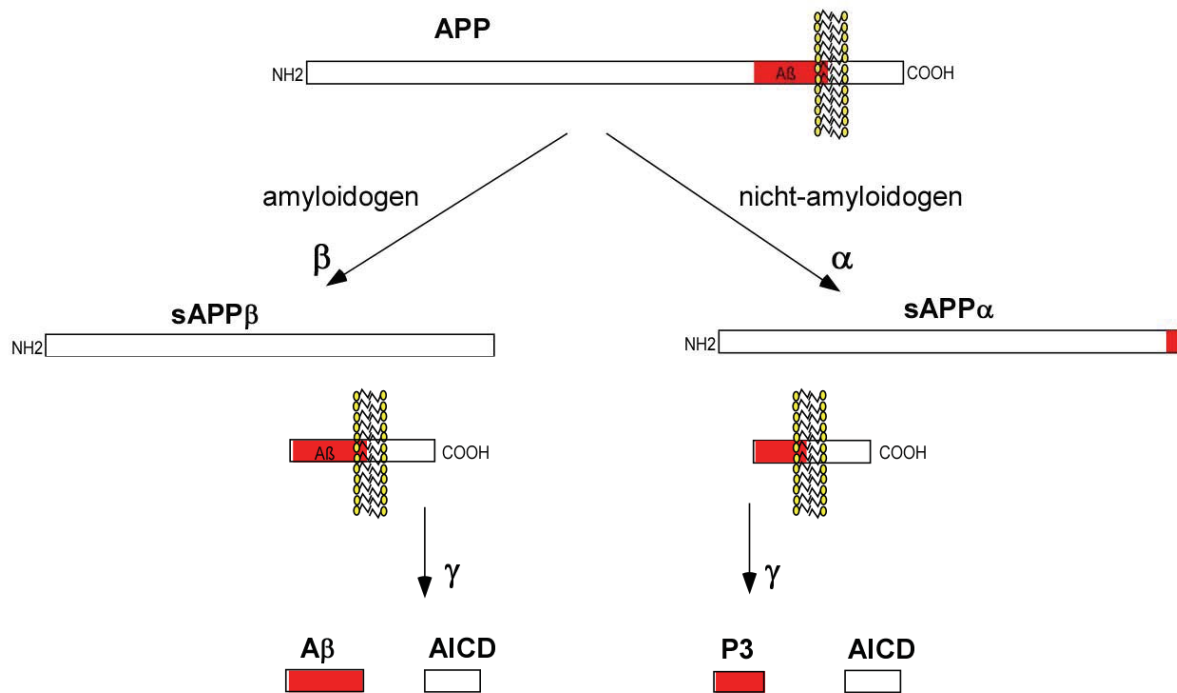


Abbildung 3: Schema der APP-Prozessierung. APP wird von drei verschiedenen Sekretase-Komplexen, die auch als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnet werden, geschnitten. Die γ -Sekretase schneidet APP innerhalb der Zytoplasmamembran wohingegen die beiden anderen Sekretasen außerhalb der Membran schneiden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dem amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung, bei dem APP von der β - sowie der γ -Sekretase geschnitten wird und dem nicht-amyloidogenen Weg, bei dem APP von der α - sowie der γ -Sekretase geschnitten wird. Auf dem amyloidogenen Weg entstehen die Spaltprodukte sAPP β , A β und AICD, auf dem nicht-amyloidogenen Weg entstehen sAPP α , P3 und AICD (modifiziert nach [18]).

Welcher Prozessierungsweg durchgeführt wird entscheidet sich hauptsächlich durch die subzelluläre Lokalisation des APP-Moleküls [27]. Ähnlich zu anderen Typ-1-Transmembranproteinen wird APP zunächst kotranslational in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums aufgenommen, bevor es in den Golgi-Apparat transportiert wird. Nach Durchlaufen des Golgi-Apparates wird APP in die Membran sekretorischer Vesikel aufgenommen und zur Plasmamembran der Zelle transportiert. Von dort wird ein Teil der APP-Moleküle wieder endozytiert und abgebaut oder erneut in die Plasmamembran integriert. Im Golgi-Apparat sowie an der Zytoplasmamembran findet hauptsächlich die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP statt. Im Gegensatz dazu wird APP in den Endosomen hauptsächlich auf dem amyloidogenen Weg prozessiert, da der hier vorherrschende niedrige pH-Wert für die Aktivität der β -Sekretase optimal ist (Abbildung 4).

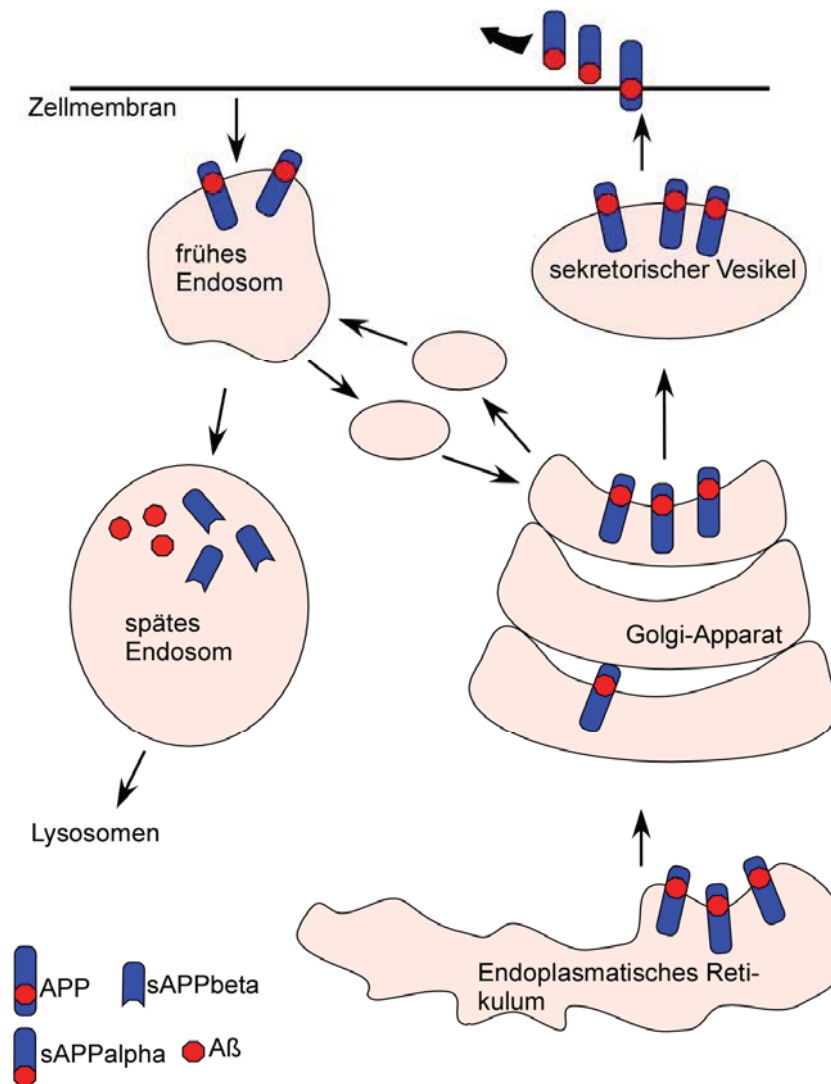


Abbildung 4: Subzellulärer APP-Transport. Nach dem Durchlaufen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates wird APP in die Zellmembran integriert. Von dort wird ein Teil der APP-Moleküle endozytiert. Die amyloidoide Spaltung von APP findet hauptsächlich in den Endosomen statt. In der Zellmembran sowie der Golgi-Membran (Prozessierung nicht dargestellt) wird APP hauptsächlich auf dem nicht-amyloiden Weg prozessiert.

In Neuronen, die sich durch ihre langen Fortsätze maßgeblich von anderen Zellen unterscheiden, wird APP außerdem in spezifischen Vesikeln entlang der Axone zu den Synapsen transportiert [27]. Nachdem APP in die axonale oder präsynaptische Membran integriert wurde, wird ein Teil der APP-Moleküle auf dem Endozytoseweg in den Zellkörper zurück oder in die Dendriten transportiert und dort erneut in die Membran integriert.

1.2.3 Zelluläre Funktionen

Unzählige Forschungsarbeiten befassten sich seit der Formulierung der Amyloidhypothese mit APP. In Relation zu den intensiven Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der AK ist jedoch bisher nur wenig über die natürlichen zellulären Funktionen von APP und seinen Spaltprodukten bekannt.

In seiner ungeschnittenen Form kann APP als Zelloberflächenrezeptor agieren. Es besitzt auf seiner extrazellulären Domäne Bereiche, die spezifische Substrate wie Heparin, Kollagen und Laminin binden können. Daneben könnten APP-Familienmitglieder über die Bildung von Homo- oder Heterodimeren auch die interzelluläre Adhäsion vermitteln [28]. Außerdem kann APP an mehrere Adapterproteine binden, die ihrerseits in verschiedene Signalkaskaden eingebunden sind [22,25]. Die Bindung von Adapterproteinen erfolgt hauptsächlich über die zytoplasmatische APP-Domäne.

Die zytoplasmatische Domäne von APP beinhaltet eine NPxY-Sequenz (x steht für eine variable Aminosäure) [29]. Sie dient als Bindestequence für Adapterproteine, die eine Phosphotyrosin-Bindestequence (PTB) tragen [30]. Es sind bereits eine Reihe von Adapterproteinen bekannt, die an die zytoplasmatische APP-Domäne binden. Darunter ist die Familie der FE65-Proteine [31]. Diese Proteine kommen in neuronalen Wachstumskegeln und Synapsen vor und interagieren unter Anderem auch mit Proteinen, die den Auf- und Abbau des zellulären Zytoskeletts regulieren. Demzufolge besteht über die Bindung von FE65-Proteinen an APP eine wichtige Verbindung zwischen APP und dem Aktin-Zytoskelett [29]. Des Weiteren ist bekannt, dass FE65-AICD-Komplexe in den Zellkern transloziert werden und dort möglicherweise als Transkriptionsfaktoren agieren [31]. Eine weitere Gruppe von Adapterproteinen, die an die zytoplasmatische NPxY-Sequenz von APP binden, sind die *c-jun N-terminal kinase (JNK) interacting proteins* (JIP). JIP sind wichtige Regulatoren der JNK-Signalkaskade, die an der Steuerung zellulärer Prozesse wie dem Zelltod oder der Zellproliferation beteiligt sind. Daneben agieren JIP auch als Adapterproteine im axonalen Transport von Vesikeln, indem sie diese mit Motorproteinen verbinden. Auf diese Weise vermitteln JIP den vesikulären Transport von APP entlang der Axone von Neuronen [32]. Neben der NPxY-Sequenz trägt die zytoplasmatische APP-Domäne weiterhin auch eine konservierte G-Protein-Bindestequence. APP kann daher auch als G-Protein-gekoppelter Rezeptor agieren [33].

Obwohl über die Funktion der Bindung vieler weiterer Adapterproteine an die zytoplasmatische Domäne von APP noch nicht viel bekannt ist, kann aus den bisherigen Studien abgeleitet werden, dass APP eine wichtige Rolle in Dynamiken neuronaler Wachstumskegel, der Migration von Neuronen und in der Steuerung intrazellulärer Signalkaskaden spielt [29].

Das im Zuge der nicht-amyloidogenen Prozessierung entstehende, lösliche APP-Fragment, sAPP α übt, wie die Ektodomäne von APLP2, eine proliferationsstimulierende Wirkung auf neuronale Vorläuferzellen aus. In adulten Neuronen besitzt sAPP α neurotrophe und morphoregulatorische Aufgaben [25]. Mäuse, denen das APP-Gen fehlt, zeigen Defizite im hippocampalen Lernen. Interessanterweise kann dieser Effekt jedoch alleine durch einen *Knock-In* von sAPP α aufgehoben werden [34].

Die genaue Funktion des im Zuge der β -Prozessierung entstehenden, löslichen Fragments sAPP β ist noch unklar. Auch die Funktionen von P3 sind noch weitgehend unbekannt.

Im Gegensatz zu den anderen APP-Fragmenten stand das A β -Peptid von jeher im Mittelpunkt der Forschung. Heute ist bekannt, dass lösliches A β in niedrigen Konzentrationen neurotroph auf undifferenzierte Neurone wirkt und in adulten Neuronen eine wichtige Rolle bei dem Schutz vor neuronaler Hyperaktivität spielt [35,36]. Fibrilläre Aggregate von A β , die auch in den Gehirnen von AK-Patienten zu finden sind, haben jedoch eine sehr potente neurotoxische Wirkung. Da das erhöhte Vorhandensein löslicher A β -Oligomere besser mit der Stärke der Demenz korreliert als das Vorhandensein der amyloiden Plaques, könnte eine erhöhte Konzentration löslicher A β -Oligomere die Ursache für die synaptischen Dysfunktion bei AK-Patienten darstellen [25]. Tatsächlich ist die Konzentration der löslichen A β -Oligomere in der Mehrzahl der Gehirne von AK-Patienten erhöht und diese Oligomere binden spezifisch an bestimmte dendritische Spines, was zu einer Veränderung der Morphologie dendritischer Spines und schließlich zum Abbau der Spines führt [37,38,39]. Interessanterweise tragen APLP1 und APLP2 im Gegensatz zu APP keine A β -Sequenz, was zeigt, dass diese Sequenz für die physiologischen Hauptaufgaben der APP-Proteinfamilie nicht essentiell ist. Vielmehr scheint diese für die AK so wichtige Sequenz einen selektiven Vorteil zu bieten, da sie zwischen den Spezies hochgradig konserviert ist [20].

APP spielt eine zentrale Rolle bei der AK, einer Erkrankung des ZNS, die mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten im Alter verbunden ist. Im gesunden Gehirn scheint APP jedoch genau für diese Fähigkeiten von großer Bedeutung zu sein. Die vielfältigen Aufgaben von APP und seinen Spaltprodukten liegen hauptsächlich in der Regulation der Morphologie von neu gebildeten und adulten Neuronen. Interessanterweise spielt APP demnach auch schon während der Embryonalentwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle. Die genauen Mechanismen der embryonalen sowie der adulten Neurogenese sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Um die Rolle von APP innerhalb dieser Prozesse zu erforschen, muß zunächst eine grundlegende Untersuchung der Neurogenese erfolgen.

1.3 Die Neurogenese

1.3.1 Phasen der embryonalen Gehirnentwicklung

Die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) von *Mus musculus* beginnt mit der Ausbildung der Neuralplatte an Tag 7,5 *post coitum* (p.c.). Die Neuralplatte bildet während der weiteren Entwicklung eine Neuralrinne. Diese beginnt sich zwischen Tag 8 und Tag 8,5 p.c. zu einem Neuralrohr zu schließen. Aus dem Neuralrohr entsteht schließlich das ZNS der Maus. Während dieses hochkomplexen Entwicklungsprozesses ist bereits früh eine Regionalisierung des ZNS erkennbar [40].

Die zellulären Hauptbestandteile des ZNS, Neurone und Gliazellen, entstehen in einem schrittweise ablaufenden Differenzierungsprozess aus embryonalen Stammzellen ([41,42,43], Abbildung 5). Embryonalen Stammzellen sind multipotenten Zellen, die in der Lage sind Tochterzellen zu generieren, die wiederum multipotent sind und daher verschiedene Zelltypen ausbilden können. In der frühen Phase der Gehirnentwicklung teilen sich die Stammzellen zunächst mehrmals mitotisch um eine bestimmte Zellzahl zu erreichen. Diese Phase wird auch als mitogene Phase der Gehirnentwicklung bezeichnet [41]. Erst später, während der so genannten neurogenen Phase der Gehirnentwicklung, differenzieren neuronale Vorläuferzellen zu Neuronen. Auf die neurogene Phase folgt schließlich die gliogene Phase der Gehirnentwicklung, in der Astrozyten und Oligodendrozyten entstehen [43]. Bei *Mus musculus* beginnt die neurogene Phase an Tag 11,5 *p.c.*. Die gliogene Phase beginnt an Tag 17 *p.c.* und erreicht ihren Höhepunkt erst nach der Geburt. Diese Zeiteinteilung ist jedoch stark vereinfacht, denn der zeitliche Ablauf der Entwicklung kann innerhalb der verschiedenen Gehirnregionen abweichen.

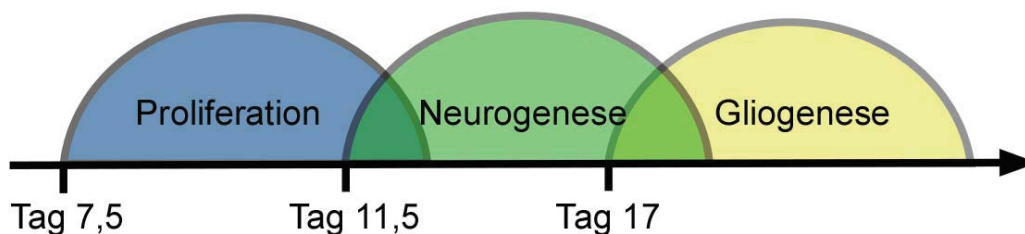


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der murinen Gehirnentwicklung. An Tag 7,5 *p.c.* beginnt die mitogene Phase der Gehirnentwicklung. An Tag 11,5 *p.c.* gehen die Vorläuferzellen dazu über, Neurone zu bilden. Auf die neurogene Phase der Gehirnentwicklung folgt ab Tag 17 *p.c.* die gliogene Phase, in der Gliazellen ausgebildet werden.

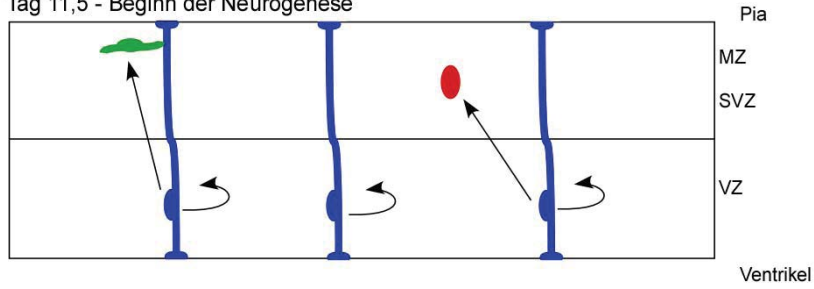
Neuralplatte und Neuralrohr bestehen bei Beginn der Gehirnentwicklung aus einer einzelnen Zellschicht, dem Neuroepithelium. Das Neuroepithelium ist aufgrund der Wanderung der Zellkörper entlang der Apikal-Basal-Achse während der Zellteilung, der interkinetischen Zellkern-Migration, pseudogeschichtet. Nach Einsetzen der neuronalen Differenzierung bilden sich mehrere Neuroepithelschichten aus. Die den Ventrikel umgebende Zellschicht wird dabei als Ventrikulärzone bezeichnet. Mit dem Übergang zur neuronalen Differenzierung verändern sich die Eigenschaften der Neuroepithelzellen, sie werden jetzt als Radialglia bezeichnet. Radialglia haben Eigenschaften von Gliazellen und eine radiale Morphologie. Ihr Zellsoma liegt in der Ventrikulärzone und sie besitzen zwei lange Zellfortsätze, einen, der bis zur Basalmembran reicht und einen, der die *Pia mater* berührt [44]. Während des Zellzyklus bewegen sich, wie schon bei den Neuroepithelzellen, die Zellkörper der Radialglia innerhalb der Ventrikulärzone auf und ab. Während der M-Phase sind die Zellkörper dabei *apikal* lokalisiert. Während der G1-Phase bewegen sie sich basalwärts um dort die S1-Phase des Zellzyklus zu durchlaufen. Durch die Zellfortsätze bleiben die Radialglia jedoch während der interkinetischen Zellkern-Migration stets mit der Basalmembran und der *apikalen Pia mater* in Kontakt [43].

Radialglia haben meist ihre Multipotenz verloren und können nur noch Neurone oder Gliazellen oder in manchen Fällen auch Beides ausbilden. Mit dem Beginn der Neurogenese entsteht aus den Neuroepithelzellen neben den Radialgliazellen auch ein zweiter Zelltyp, die basalen Vorläuferzellen. Sie unterscheiden sich von den Radialgliazellen im Wesentlichen dadurch, dass ihre Mitose an der basalen und nicht an der *apikalen* Seite der Ventrikulärzone stattfindet. Die basalen Vorläuferzellen bilden später in der Gehirnentwicklung die Subventrikulärzone aus. Sie ist noch im adulten Gehirn eine Region, in der Neurogenese stattfindet.

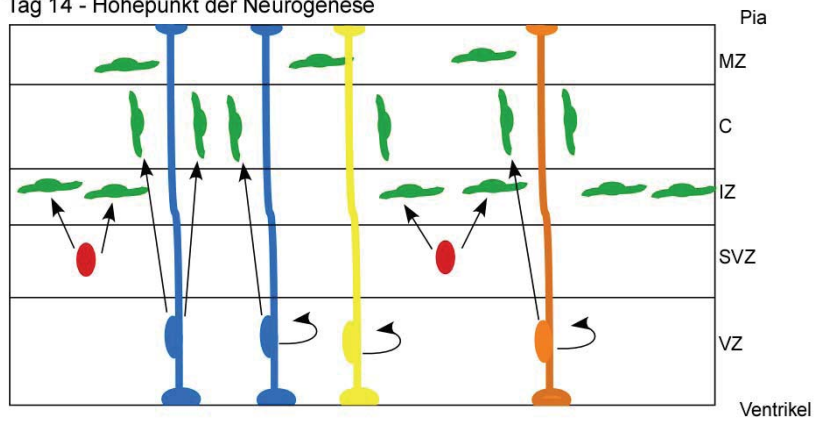
Prinzipiell können sich alle Vorläuferzellen während der Gehirnentwicklung auf zwei unterschiedliche Weisen teilen. Es findet entweder eine asymmetrische oder eine symmetrische Zellteilung statt. Bei der symmetrischen Teilung entstehen aus einer Zelle zwei gleiche Zelltypen. Während der mitogenen Phase entstehen so aus einer Vorläuferzelle zwei neue Vorläuferzellen. Während der neurogenen oder der gliogenen Phase entstehen dagegen aus einer Vorläuferzelle zwei Neurone oder zwei Gliazellen. Bei der asymmetrischen Teilung entsteht aus einer Vorläuferzelle eine Vorläuferzelle und ein Neuron beziehungsweise eine Gliazelle [43]. Die asymmetrische Zellteilung überwiegt jeweils bei Beginn der neurogenen und gliogenen Phase. Später gehen dann mehr und mehr Zellen zur symmetrischen Zellteilung über ([43], Abbildung 6).

■ ■

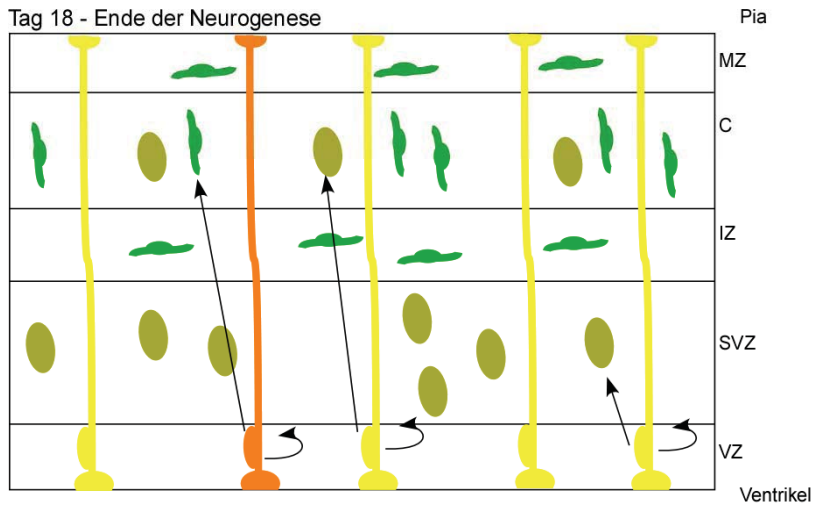
Tag 11,5 - Beginn der Neurogenese



Tag 14 - Höhepunkt der Neurogenese



Tag 18 - Ende der Neurogenese



- Neuroepithelzellen
- basale Vorläuferzellen
- neurogene Radialglia
- bipotente Radialglia
- gliogene Radialglia
- Neurone
- Gliazellen
- ↻ Selbsterneuerung

Abbildung 6: Schematische Übersicht über die verschiedenen Zelltypen während der Neurogenese-Phase der Gehirnentwicklung. In der frühen Neurogenese-Phase (ab Tag 11,5 *p.c.*) teilen sich Neuroepithelzellen vorwiegend symmetrisch in zwei Neuroepithelzellen. Daneben findet eine asymmetrische Teilung in eine Neuroepithelzelle und ein Neuron oder eine basale Vorläuferzelle statt. Am Höhepunkt der Neurogenese-Phase (um Tag 14 *p.c.*) teilen sich neurogene Radialglia und basale Vorläuferzellen vorwiegend symmetrisch in je zwei Neurone. Auch gliogene Radialglia teilen sich, bilden aber noch keine Gliazellen aus. Ein dritter Typ der Radialglia, die bipotenten Radialgliazellen, teilen sich asymmetrisch in eine Radialglia und ein Neuron. Gegen Ende der Neurogenese-Phase (Tag 18 *p.c.*) haben die gliogenen Radialglia bereits begonnen Gliazellen auszubilden. Bipotente Radialglia gehen von der Neurogenese zur Gliogenese über. Während der Neurogenese-Phase bilden sich innerhalb des Neuroepitheliums mehrere Zonen aus, die Ventrikulärzone (VZ), die Subventrikulärzone (SVZ), die intermediäre Zone (IZ), die Corticalplatte (C) und die Molekularschicht (MZ, modifiziert nach [43]).

1.3.2 Molekulare Mechanismen der embryonalen Neurogenese

Die Zelldifferenzierung während der embryonalen Gehirnentwicklung wird mit Hilfe von komplexen Regulationsmechanismen determiniert und koordiniert. Einige dieser Mechanismen wurden bereits intensiv erforscht [45]. Trotz aller Bemühungen ist das heutige Wissen über die Differenzierungsprozesse jedoch noch sehr lückenhaft. Prinzipiell unterscheidet man zwei Klassen determinierender Faktoren, extrinsische Faktoren, die aus der Zellumgebung über die Bindung an Transmembranrezeptoren auf die Zellen einwirken und intrinsische, zelleigene Faktoren.

Die Umstellung der Radialglia von der Proliferation zur Neurogenese ist mit einer Verlängerung der G1-Phase des Zellzyklus verbunden [46]. Auf dieser Beobachtung basiert die Hypothese, dass die Länge des Zellzyklus eine Schlüsselrolle für das Schicksal der Vorläuferzellen spielt [43]. So kann ein extrinsischer oder intrinsischer Faktor eine Veränderung des Zellschicksals nur dann bewirken, wenn er ausreichend lange auf eine Zelle einwirken kann. Die Länge des Zellzyklus kann also die Wirkungsweise determinierender Faktoren bestimmen.

Auf molekularer Ebene sind bereits mehrere determinierende Faktoren bekannt, die auf vielerlei Weise miteinander interagieren. Ein determinierender Faktor ist der Notch-Signalweg. In diesem Signalweg spielt der membranständige *Notch-Rezeptor* eine zentrale Rolle. Der *Notch-Rezeptor* wird durch die Liganden *Delta* und *Jagged* aktiviert, zweier Transmembranproteine, die von Nachbarzellen exprimiert werden. Nach der Aktivierung erfolgt die Freisetzung eines intrazellulären Fragmentes von Notch, der *Notch-intracellular domain* (NICD). Im Zellkern bildet die NICD einen Komplex mit an die DNA bindenden Repressorproteinen. Durch die Bindung des NICD werden diese inaktiv und verschiedene Gene wie beispielsweise die proneurogenen Transkriptionsfaktoren *Hes1* und *Hes5* werden exprimiert [47]. Der Notch-Signalweg spielt auf diese Weise eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Neurogenese. Mausembryonen, die einen mutierten Notch1-Rezeptor tragen, sterben kurz vor Tag 11,5 *p.c.*, dem Zeitpunkt des Überganges von der mitogenen in die neurogene Phase der Gehirnentwicklung [48]. Die Hauptaufgabe des Notch-Signalwegs ist die Unterdrückung der symmetrischen

neuronalen Differenzierung zu Gunsten der asymmetrischen Teilung der Radialglia in je eine Radialglia und ein Neuron.

Ein weiterer wichtiger Signalweg ist der kanonische Wnt-Signalweg. Er stimuliert während der mitogenen Phase die Zellproliferation. Dementsprechend bewirkt in dieser Phase eine Überexpression von β -Catenin, dem zentralen Signalmolekül des Wnt-Signalwegs, die übermäßige Proliferation der Vorläuferzellen [49]. Während der späten Neurogenesephase ändert sich jedoch die Wirkungsweise des Wnt-Signalwegs. So bewirkt jetzt die Überexpression von β -Catenin die symmetrische Teilung und Differenzierung der Radialglia zu Neuronen [50]. Der Mechanismus, der die unterschiedliche Wirkungsweise des Wnt-Signalwegs bewirkt, ist bisher unbekannt. Die Länge des Zellzyklus könnte hierbei jedoch eine Rolle spielen.

Neben dem Notch- und dem Wnt-Signalweg bestimmen auch verschiedene extrazelluläre Wachstumsfaktoren das Zellschicksal. Beispielsweise regt der Wachstumsfaktor *Platelet derived neurotrophic factor* (PDGF) die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Neuronen an [51]. Auf Ebene der intrinsischen Determinanten sind mehrere Transkriptionsfaktoren in die frühe Gehirnentwicklung involviert. Am bekanntesten sind hierbei die *basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren* (bHLH), zu denen auch *Hes1* und *Hes5* zählen [47], sowie der Transkriptionsfaktor *Pax6* [45].

Die determinierenden Faktoren bestimmen das Zellschicksal. Daneben muss aber im Zuge der Zelldifferenzierung auch die Expression vieler anderer Proteine angepasst werden, denn Neurone unterscheiden sich stark von allen anderen Zelltypen tierischer Gewebe. Sie sind die am höchsten differenzierten Zellen. Adulte Neurone besitzen meist mehrere Dendriten und ein Axon. Diese stark polarisierte Struktur dient der Aufnahme, der Integration und der Weiterleitung von Nervenimpulsen. Auf molekularer Ebene besitzen Neurone eine relativ stark ausgeprägte Translationsmaschinerie, was zeigt, dass die Proteinsynthese zu den wichtigsten molekularen Funktionen der Neurone gehört [52]. Neurone sind zudem aus dem Zellzyklus ausgetreten. Die Proteomveränderungen im Zuge der Neurogenese sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.3.3 Adulte Neurogenese

Neben der embryonalen Neurogenese können auch im adulten Gehirn von Säugetieren neue Neurone gebildet werden [53]. Allerdings erfolgt die adulte Neurogenese vor allem an zwei bestimmten Orten des Gehirns, der subgranulären Zone des *Gyrus dentatus*, einer Region des Hippocampus, und der Subventrikularzone des lateralen Hirnventrikels. Die neu gebildeten Neurone wandern oft über weite Strecken an ihren Zielort wo sie zunächst ausreifen. Während der Reifungsphase werden die Neurone dann über synaptische Verbindungen in die existierenden neuronalen Schaltkreise integriert. Scheitert die Integration, so sterben die Neurone wieder ab. Die strukturelle und funktionelle Integration der Neurone erfolgt innerhalb eines kritischen Zeitfensters von circa einer Woche bis drei Wochen nach der Neubildung [53].

Die adulte Neurogenese wird oft mit bestimmten Formen des Lernens in Verbindung gebracht, so ist beispielsweise bekannt, dass sich die Exposition von Mäusen in eine mit Reizen angereicherte Umgebung positiv auf das Überleben neu gebildeter Neurone aus der sugranulären Zone des *Gyrus dentatus* auswirkt [54]. Weiterhin schneiden bestimmte transgene Mäuse, deren Neurogeneserate vermindert ist, in vom Hippocampus abhängigen Lernaufgaben schlechter ab [53].

Einblicke in die molekularen Mechanismen der embryonalen Neurogenese können auch zum Verständnis der adulten Neurogenese beitragen. Auch hier wird das Zellschicksal von einer Reihe extrinsischer und intrinsischer Faktoren bestimmt. Interessanterweise schienen dies dieselben Faktoren zu sein, die schon während der embryonale Neurogenese aktiv waren [55].

1.3.4 Rolle des Amyloiden Precursor Proteins in der Neurogenese

Die Erforschung der Neurogenese ist vor allem im Zusammenhang mit der AK von besonderem Interesse [56]. Es ist bekannt, dass die Neurogeneserate bei Alzheimer-Patienten sowie bei Mausmodellen für die AK verändert sein kann. Dieser Befund ist jedoch bei Menschen noch unzureichend untersucht. In Mausmodellen für die AK, die auf APP-Mutationen basieren, wurde bereits mehrfach eine Verminderung der adulten Neurogeneserate nachgewiesen [57].

APP scheint außerdem eine wichtige Rolle bei der postläsionalen neuronalen Regeneration zu spielen. Nach einer Verletzung des Gehirngewebes von *Drosophila melanogaster* kommt es zu einer mehrere Tage anhaltenden, dramatischen Hochregulierung der APPL-Expression in den verletzten Hirnarealen [58].

Während der Embryonalentwicklung wird APP bei Mäusen erstmals an Tag 9,5 *p.c.* von differenzierten Neuronen exprimiert [59]. Zudem sind in embryonalen Radialgliazellen hohe Konzentrationen von APP zu finden [60]. Da APP scheinbar eine zentrale Rolle bei der Entstehung der AK spielt, sollte die Funktion von APP und seinen Spaltprodukten in allen relevanten Stadien, also auch während der Embryonalentwicklung untersucht werden.

1.4 Das APP23-Mausmodell für die Alzheimer-Krankheit

Eine Möglichkeit die Funktionsweise von APP im Gehirn zu studieren, bildet die Untersuchung von Modellorganismen. Unter den Säugetieren wird aufgrund der genetischen Zugänglichkeit und kurzen Generationszeit meist die Hausmaus (*Mus musculus*) gewählt. Mausmodelle, die der Untersuchung der AK dienen, wurden hauptsächlich auf Grundlage der familiären AK, bei der das APP-Prozessierungsgleichgewicht in Richtung amyloidogene Spaltung verschoben ist, generiert. Die ersten Mausmodelle für die AK exprimierten humanes, mutiertes APP und wiesen amyloide Plaques auf, die erstmals im Alter von sechs bis neun Monaten auftraten [61,62]. Später wurden Mäuse, die mutiertes APP exprimierten mit Mäusen gekreuzt, die entsprechend

der familiären AK mutiertes Präsenilin exprimierten. Die entstandenen doppeltransgenen Mäuse wiesen eine verstärkte Bildung von Amyloidplaques auf [63]. Keines der bis heute generierten Mausmodelle weist jedoch alle Aspekte des menschlichen Krankheitsbildes auf [64].

Eines der bekanntesten Mausmodelle für die AK ist das so genannte APP23-Modell. Es wurde erstmals 1997 von *Sturchler-Pierrat et al.* beschrieben [65]. Sie erzeugten zwei transgene Mauslinien, die humanes APP, das eine als „Schwedische Mutation“ (K670N/M671L, Abbildung 7) bekannte Doppelmutation trug, überexprimierten. Eines der beiden Modelle, Linie 23, ist auch als APP23-Mausmodell bekannt und wurde seitdem intensiv erforscht. Die transgenen Mäuse wurden auf einem hybriden C57BL/6xDBA2 Hintergrund generiert und anschließend über zwanzig Generationen auf den genetischen Hintergrund der Mauslinie C57BL/6 zurückgekreuzt.

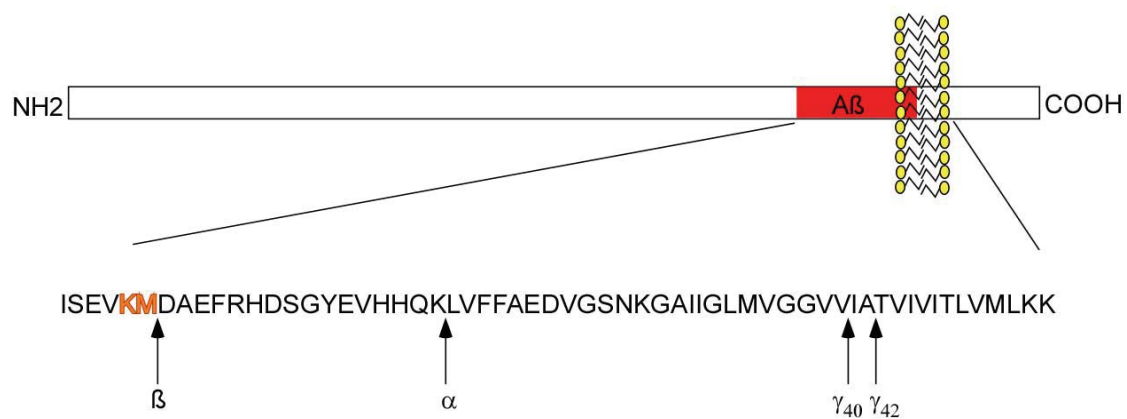


Abbildung 7: Lage der Schwedischen Mutation (K670N/M671L) im humanen APP. Die betroffenen Aminosäuren sind orange dargestellt (nicht-mutierte Version). Die Mutation grenzt direkt an die Bindungsstelle der β -Sekretase (β) und bewirkt eine Verschiebung des APP-Prozessierungsgleichgewichts in Richtung amyloidogene Spaltung.

Das transgene Mausmodell APP23 exprimiert das humane APP₇₅₁ mit der Schwedischen Doppelmutation unter Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotors sieben Mal stärker, verglichen mit dem endogenem, murinem APP. APP23-Mäuse entwickeln erste Amyloidplaques im Alter von sechs Monaten im Hippocampus und Neocortex, die sich im Laufe des Alterns über weitere Gehirnregionen ausbreiten. Des Weiteren weisen sie im Alter auch andere histopathologische Merkmale und biochemische Veränderungen auf, die bei humanen AK-Patienten zu finden sind. So kommt es zu Entzündungsreaktionen, Synapsendegeneration, dem Absterben von Neuronen und der Hyperphosphorylierung des *Tau-Proteins* [66]. Zudem weisen APP23-Mäuse schon im Alter von drei Monaten Beeinträchtigungen der Lernfähigkeit auf. Diese Symptome treten schon weit vor der Bildung erster Amyloidplaques. Da die Aβ-Produktion schon vor dem Auftreten erster kognitiver Beeinträchtigungen erhöht ist und über das Auftreten der Beeinträchtigungen hinweg lange Zeit stabil bleibt, kann auch sie nicht die

alleinige Ursache der kognitiven Beeinträchtigungen darstellen [67,68]. Aus diesem Grunde wäre eine intensive Untersuchung früher Altersstadien der APP23-Mäuse von großer Bedeutung für eine Aufklärung der Ursachen für die AK.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Studie sollte mit Methoden der Proteomanalyse (hochauflösende, zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie) untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß sich das Gehirnproteom des APP23-Mausmodells für die AK von dem der Wildtypmäuse unterscheidet. Dabei sollte ein Lebensprofil der Proteomveränderungen erstellt werden, das vor allem frühe Altersstadien, in denen noch keine AK-Symptome erkennbar sind, beinhaltet. Das Ziel hierbei war festzustellen, ob und wie der Krankheitsverlauf im Gehirn mit Proteomveränderungen korreliert ist.

Die Arbeit basiert auf der Hypothese, dass die gesamte Gehirnentwicklung als Folge der Mutation von APP, einem wichtigen morphoregulatorischen Protein, gestört ist, was schließlich in der Ausprägung der AK resultiert. Diese Veränderungen müssten sich auch auf Proteomebene manifestieren und zwar von dem Zeitpunkt an, an dem das transgene APP zum ersten Mal exprimiert wird.

Das Ziel der Arbeit war fernerhin, variante Proteine zu identifizieren, sie auf Basis bekannter Daten zu charakterisieren und ihre Rolle in der Entstehung der AK zu diskutieren. Verbunden damit war die Hoffnung, Proteomveränderungen zu finden, die für eine frühe Diagnose und Therapie der AK von Bedeutung sind.

Um die Arbeitshypothese zu prüfen wurden die, für die AK besonders relevanten Gehirnregionen Hippocampus und Cortex untersucht. Dies erfolgte bei einen, zwei, sieben und fünfzehn Monate alten Mäusen. Da APP auch schon während der Embryonalentwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle spielt, wurde zudem ein embryonales Stadium (Tag 16 *p.c.*) untersucht. Die Plaquebildung, als ein erstes pathologisches Merkmal der AK, setzt bei den APP23-Mäusen jedoch erst im Alter von sechs Monaten ein.

In Zukunft soll zudem eine detaillierte Untersuchung der Neurogenese von APP23-Mäusen folgen. Als Grundlage hierfür wurde eine Analyse der Proteomveränderungen, die im Zuge der normalen embryonalen Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neuronen auftreten, durchgeführt. Hierfür wurden Mausembryonen des Inzuchtstammes C57BL/6, auf dem auch das APP23-Mausmodell basiert, an den Entwicklungsstufen Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5 *p.c.* analysiert. Diese Entwicklungsphase umfasst den Übergang von der mitogenen in die neurogene Phase der Gehirnentwicklung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden (Tabellen 1, 2 und 3) sind alle verwendeten Materialien alphabetisch aufgelistet.

2.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Typenbezeichnungen und Hersteller verwendeter Geräte und deren Zubehör

Gerät / Zubehör	Typenbezeichnung	Hersteller
Blotting-Apparatur	Trans-Blot® SD	Bio- Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Elektrophoresekammer (IEF)	Elektrophoresekammer	Wita GmbH (Berlin, Deutschland)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE, Kleingeltechnik)	Mini Protean 2, Elektrophoresekammer	Bio- Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
ESI-Massenspektrometer	LCQ Deca Ion Trap	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Feinwaage	BP 301 S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Glaskugeln	Durchmesser: 2,5 oder 0,11 mm	Worf Glaskugeln GmbH (Mainz, Deutschland)
Glasplatten	Glasplatten (40 x 30 cm)	Berlin Glas OHG (Berlin, Deutschland)
Glasplatten (mit geringer Eigenfluoreszenz)	Borsilikat- Glasplatten (40 x 30 cm)	Berlin Glas OHG (Berlin, Deutschland)

Glasröhrchen	zylindrische Glasröhrchen	Schott AG (Mainz, Deutschland)
Hamilton- Spritzen	Hamilton- Spritzen, verschiedene Größen	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Kühlzentrifuge	Varifuge 3,0 R	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, Deutschland)
Laserscanner	Typhoon 9400	GE Healthcare (München, Deutschland)
MALDI-Massenspektrometer	Bruker Reflex III	Bruker-Daltonik (Bremen, Deutschland)
Mikrospektrometer	Ultrospec [®] 3100 pro	GE Healthcare (München, Deutschland)
Mörser	Mörser	Wita GmbH (Berlin, Deutschland)
Plastikküvetten	Plastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Spannungsgerät	EPS 3500XL	GE Healthcare (München, Deutschland)
Tischzentrifuge	Micro-Centrifuge 2	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK 31	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Typenbezeichnungen und Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial (Abkürzung)	Typenbezeichnung	Hersteller

Autoradiographiefilm	Hyperfilm-ECL	GE Healthcare (München, Deutschland)
AnchorChips®	AnchorChips®	Bruker-Daltonik (Bremen, Deutschland)
Benzonase	Benzonase	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
BSA	Rinderserum- Albumin	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Chromatographiepapier	Chromatographiepapier, 1mm stark	Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Eppendorfgefäße	Eppendorfgefäße, verschiedene Größen	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
ECL-Kit	ECL-Plus Western Blotting Detection reagents	GE Healthcare (München, Deutschland)
Femto-ECL-Kit	Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fischer Scientific Inc. (Rockford, IL, USA)
Fluoreszenzfarbstoffe	Cy3, Cy5; (minimal dyes / saturation dyes)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Ionenaustauscher	Amberlite® IRN-150	Sigma- Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Magermilchpulver	fettarmes Magermilchpulver	verschiedene Hersteller
Nylonfaden	Angelschnur (Durchmesser: 0,7 mm)	Ertner; Deutschland
Parafilm M®	Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging (Neenah, WI, USA)
Pepstatin A	Pepstatin A	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim,

		Deutschland)
Phosphatase Inhibitor Cocktail	PhosSTOP, Tabletten	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Poros 10 R1 Beads	Poros 10 R1 Beads	Perseptive BioSystems (Cambridge, England)
Protease Inhibitor Cocktail	Complete Protease Inhibitor, Tabletten	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
PVDF-Membran	Immobilon-P	Millipore (Billerica, MA, USA)
Reinigungslösung für Gelröhrchen	Deconex [®] -12-Lösung	Borer Chimie (Zuchwil, Schweiz)
Roti [®] -Nanoquant Lösung	Roti [®] -Nanoquant Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Scheuermittel	Haushaltsscheuermittel	Verschiedene Hersteller
Silikonfett	Baysilone Paste	Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien

Chemikalie (Abkürzung)	Chemikalie	Hersteller
Acetat	Natriumacetat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Agarose	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Acrylamid	Acrylamid, 99,9%	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Acrylamid (SDS-PAGE)	4 x Acrylamid (Sonderabfüllung)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ameisensäure	Ameisensäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Aminocapronsäure	ϵ -Aminocapronsäure	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ammoniumcarbonat	Ammoniumcarbonat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Ampholin	Ampholinmix (pH 3,5-10)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Ampholyt	Pharmalyte (pH 4-6,5)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Ampholyt	Pharmalyte (pH 8)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Azetonitril	Azetonitril	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Bis-Acrylamid	N,N-Methylenbisacrylamid 2 x (Sonderabfüllung)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Bromphenolblau	Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Carbonat	Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino] –propansulfat	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
DMF	Dimethylformamid; 99,8%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze,

	wasserfrei	Deutschland)
DTT	Dithiothreitol	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Essigsäure	Essigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Ethanol	Herbeta-Arzneimittel (Berlin, Deutschland)
Ethanol (unvergällt)	Ethanol (unvergällt)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamin	Ethylendiamin	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Formalin	Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehyd	Glutaraldehydlösung, 25%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Glyzerin; 87%, wasserfrei	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Glycin	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Harnstoff	Harnstoff, hochrein	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Harnstoff (für Laufpuffer)	Harnstoff	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
Hydrogenchlorid	Hydrogenchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Hydrogencarbonat	Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Kaliumchlorid	Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Lysin	L-2,6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Methanol	Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Magnesiumdichlorid-6-hydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
PDA	Electrophoresis purity reagent	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Persulfat (APS)	Ammoniumpersulfat	Biorad (Hercules, CA, USA)
Phosphorsäure	Ortho-Phosphorsäure, 85%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Natriumdodecylsulfat	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Sephadex	Sephadex G-200	GE Healthcare (München, Deutschland)
Servalyt 2-4	Servalyt (pH 2-4)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Servalyt 2-11	Servalyt (pH 2-11)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Servalyt 6-9	Servalyt (pH 6-9)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Silbernitrat	Silbernitrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

TFA	Trifluoressigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl) Phosphin Hydrochlorid	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Thimerosal	Thimerosal [®]	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Thioharnstoff	Thioharnstoff	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Thiosulfat	Natriumthiosulfat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Titriplex	Titriplex 3	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tris Base	Trizma [®] Base	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Tris-HCl	Trometamol-Hydrochlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	Trypsin	Promega (Madison, WI, USA)
TWEEN	Polysorbat 20	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Ampholinmix	1 Teil Ampholin (pH 3,5-10), 1 Teil Servalyt (pH 2-11); 1 Teil Servalyt (pH 6-9); 3 Teile

	Ampholyt (pH 4-6,5); 2 Teile Ampholyt (pH 5-8)
Anodenpuffer (für die IEF)	3 M Harnstoff; 0,742 M Phosphorsäure; in bidestilliertem H ₂ O
Anodenpuffer (für das Immunoblotting)	0,3 M Tris-Base; 20% Methanol (v/v); in bidestilliertem H ₂ O; pH 10,4
Blockierungspuffer	10 mM Tris-HCl; 0,133 M NaCl; 0,1% TWEEN20 (v/v); 10% Magermilchpulver (w/v); in bidestilliertem H ₂ O
Capgellösung (für die IEF)	12% Acrylamid (w/v); 0,13% PDA (w/v), 4% Carrier Ampholyt Mix (v/v) 9 M Harnstoff; 5 % Glycerin (w/v); 0,06% TEMED (v/v); 0,03% Persulfat (w/v, frisch zugesetzt); in bidestilliertem H ₂ O
Entwicklerlösung (für die Silberfärbung)	2,5% Na-Carbonat (w/v), 0,01% Formalin (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Fixierlösung (für die Silberfärbung)	50% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Gellösung (für die SDS-PAGE)	15% Acrylamid (w/v); 0,2% Bisacrylamid (w/v); 0,03% TEMED (v/v); 0,1% SDS (w/v); 375 mM Tris Base; 125 mM Tris-HCl; 0,08% Persulfat (frisch dazugegeben); in bidestilliertem H ₂ O
Inkubationslösung	125 mM Tris Base; 40% Glycerin; 65 mM DTT; 3% SDS; in bidestilliertem H ₂ O
Inkubationslösung (für die Silberfärbung)	0,5 M Na-Acetat, 0,1% Na-Thiosulfat (w/v), 30% Ethanol (v/v), 0,5% Glutaraldehyd (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Kathodenpuffer (für die IEF)	0,749 M Ethylendiamin; 3 M Harnstoff; 5% Glycerin (w/v); in bidestilliertem H ₂ O
Kathodenpuffer (für das Immunoblotting)	0,04 M ϵ -Aminocapronsäure; 0,025 M Tris- Base; 20% Methanol; in bidestilliertem H ₂ O; pH 9,4

Laufpuffer (für die SDS-PAGE)	0,3% Tris Base (w/v); 1,44% Glycin; 0,1% SDS
Lysinlösung	10 mM Lysin in bidestilliertem H ₂ O
Matrixlösung	0,1% HCCA in (1:1 Azetonitril / TFA) (v/v)
Membranpuffer	0,025 M Tris Base; 20% Methanol (v/v); in bidestilliertem H ₂ O; pH 10,4
Magnesiumlösung	5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; in Probenpuffer
Markierungspuffer (Minimal Labeling)	6,5 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 30 mM Tris-Base; 4% CHAPS (w/v); in bidestilliertem H ₂ O; pH 9,0
Phosphataseinhibitor-lösung	1 Tablette PhosStop in 1 ml bidestilliertem H ₂ O
Physiologische Kochsalzlösung	0,9% NaCl (w/v) in bidestilliertem H ₂ O
Probenpuffer	0,05 M Tris-Base; 0,05 M KCl; 20% Glycerin (v/v); 65% (Gehirnproben) oder 81% (embryonales Gewebe) CHAPS (w/v; frisch zugesetzt); in bidestilliertem H ₂ O; pH 7,5
Proteaseinhibitorlösung (H1)	1 Tablette Complete in 2 ml bidestilliertem H ₂ O
Proteaseinhibitorlösung (H2)	1,5 mM Pepstatin A (w/v) in Ethanol
Proteaselösung	0,05 µgTrypsin in 1 ml bidestilliertem H ₂ O
Schutzlösung	5 M Harnstoff; 5% Glycerin (v/v); 2% Servalyt 2-4 (v/v); in bidestilliertem H ₂ O
Sephadexlösung	12,5% Sephadex (für fünf Stunden bei 90°C in bidestilliertem H ₂ O aufgequollen); 9 M Harnstoff, 70 mM DTT; 2% Ampholinmix (w/v); Harnstoff, DTT und Ampholinmix frisch zugegeben

Servalytlösung	10% Servalyt 2-4 (v/v); 6 M Harnstoff; in bidestilliertem H ₂ O
Silberlösung (für die Silberfärbung)	0,1% Silbernitrat (w/v), 0,01% Formalin (v/v) in bidestilliertem H ₂ O
Spüllösung (für die Silberfärbung)	2,5% Natriumcarbonat in bidestilliertem H ₂ O
Stopplösung (<i>Saturation Labelling</i>)	0,05 M Titriplex; 0,02% Thimerosal in bidestilliertem H ₂ O
Stopplösung (für die Silberfärbung)	0,05 M Titriplex, 0,02% Thimerosal (w/v)); in bidestilliertem H ₂ O
TCEP-Lösung	2mM TCEP in bidestilliertem H ₂ O
Trenngellösung (für die IEF)	3,5% Acrylamid (w/v); 0,3% PDA (w/v); 4% Carrier Ampholyt Mix (v/v); 9 M Harnstoff; 5% Glycerin (w/v); 0,06 % TEMED (v/v); 0,03% Persulfat (w/v, frisch zugesetzt); in bidestilliertem H ₂ O
Unterschichtungslösung	8 M Harnstoff; 40% Glycerin (v/v)
Verdaupuffer	10 mM NH ₄ HCO ₃ in bidestilliertem H ₂ O
Verdaupuffer (modifiziert)	10 mM NH ₄ HCO ₃ / Azetonitril (1:1)
Waschpuffer	20 mM Tris-Base; 0,9% NaCl (w/v); 0,1% TWEEN20 (v/v); in bidestilliertem H ₂ O; pH 7,5

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Herkunft, Hersteller und eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Antikörper im Immunoblot

Antikörper:	Herkunft,	Hersteller	Kontentration im
-------------	-----------	------------	------------------

Anti-	(Klon)		Immunoblot
Cleaved Notch1 (NICD)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)	1:1000
Humanes APP (A β)	Maus, 6E10	Signet Laboratories (Dedham, MA, USA)	1:1000
RhoA	Kaninchen, 67B9	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)	1:1000
TCTP (Tpt1)	Kaninchen, polyklonal	Abcam plc (Cambridge, UK)	1:250

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Gewebepreparation

Alle Arbeiten mit Versuchstieren wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Zur Gewinnung von Mausembryonen wurden männliche und weibliche Hausmäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 aus der Zucht des Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) erworben, in den hauseigenen Tierstall integriert und verpaart. Trächtige Hausmäuse wurden 9,5; 11,5 oder 13,5 Tage *p.c.* durch Genickbruch getötet und umgehend präpariert. Die Bauchhöhle des Muttertiers wurde geöffnet, die Gebärmutter wurde entnommen und in 37°C warme, physiologische Kochsalzlösung überführt. Die Embryonen wurden aus der Gebärmutter frei präpariert, in frische, 37°C warme physiologische Kochsalzlösung überführt und aus den embryonalen Eihüllen frei präpariert. Da die Embryonen eines Wurfes sich in ihrem Entwicklungsfortschritt unterscheiden können wurde das genaue Entwicklungsstadium jedes Embryos nach der Anzahl der Somiten, der Körperlänge und dem Entwicklungsstand der erkennbaren Organ- und Extremitätenanlagen bestimmt. Hierfür wurden Angaben zu den entsprechenden Kriterien aus der Fachliteratur (Theiler-Stadien, [69]) herangezogen. Als Tag 9,5 *p.c.* wurden diejenigen Embryonen eingeordnet, bei denen 21 bis 29 Somiten gezählt wurden und die 1,8 bis 3,3 mm lang waren. Weiterhin mußte die Neuralrinne *anterior* bereits zu einem Neuralrohr geschlossen sein (Theiler-Stadium 15). An Tag 11,5 *p.c.* mußten eine Anzahl von über 45 Somiten, sowie eine Körperlänge von 9 bis 11 mm vorhanden sein. Außerdem sollte der Linsenvesikel sich bereits deutlich vom Ektoderm abheben und schwarz pigmentiert sein (Theiler-Stadium 19). Tag 13,5 *p.c.* Embryonen zeichneten sich durch eine Körperlänge von ca. 11 mm aus, äußerlich mußte eine deutliche Einbuchtung der Fingeranlagen an den Vorderextremitätenanlagen vorhanden sein (Theiler-Stadium 21). Hatten die Embryonen die entsprechenden Kriterien erfüllt, so wurden sie für die Gewinnung von Gehirngewebe herangezogen. Hierfür wurde der Kopf der Embryonen abgetrennt. Der Schnitt wurde immer direkt *anterior* vor der Ohranlage angesetzt und *posterior* der Unterkieferanlage beendet. Die Kopf- und Rumpfteile der Embryonen wurden direkt nach der Präparation gewogen, umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Gehirnproben des Mausmodells „APP23“ für die AK sowie die zum Vergleich dienenden Proben gleichaltriger und gleichgeschlechtlicher Wildtypmäuse wurden von der Novartis Pharma GmbH (Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz) bezogen. Es wurden Cortices von elf transgenen und elf Wildtypembryonen im Alter von 16 Tagen *p.c.*, sowie Cortices und Hippocampi von jeweils acht bis zehn transgenen und acht bis zehn Wildtypmäusen (männlich) der Altersstadien ein, zwei, sieben und fünfzehn Monate bezogen. Das APP23-Mausmodell war bereits für weit über 20 Generationen auf den C57BL/6-Stamm zurückgekreuzt worden.

Generell wurden die Gewebeproben aller Tiere durchnummeriert. Eine transgene Gewebeprobe wurde jeweils einer Kontrollgewebeprobe (Wildtyp) zugeordnet. Die so entstandenen Probenpaare wurden zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit durchgehend parallel verarbeitet und analysiert.

2.2.2 Proteinextraktion

Die hier angewandte Methode zur Proteinextraktion wurde bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben [70]. Im Wesentlichen wurde tiefgefrorenes Gewebe zunächst mechanisch sehr fein zerkleinert um die Zellstruktur weitgehend zu zerstören. Das Pulver wurde danach aufgetaut und mit Ultraschall behandelt, um alle Membranstrukturen, insbesondere die der Nuklei, vollständig aufzubrechen. Um die zellulären Proteine in Lösung zu bringen, wurden das Detergenz CHAPS sowie das chaotrope Agens Harnstoff eingesetzt, DNA-gebundene Proteine wurden durch eine DNase-Behandlung (Benzonase) freigesetzt. Zu der Gewebeprobe wurde außerdem ein Gemisch an Proteaseinhibitoren hinzugefügt, um den Abbauprozess von Proteinen durch zelleigene Proteasen zu inhibieren. Ziel dieser Methode war es, alle zellulären Proteine in Lösung zu bringen sowie gleichzeitig deren Abbau zu verhindern. Das so gewonnene Proteinextrakt wurde im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgt die genaue Arbeitsanweisung.

Bei -80°C gelagerte Gewebeproben mit bekanntem Gewicht (die Proben wurden vor dem Einfrieren gewogen) wurden in einen Mörser überführt, der sich, ungefähr zur Hälfte in flüssigen Stickstoff getaucht, in einer Styropor-Box befand. Dann wurden Probenpuffer und Proteaseinhibitorlösung (H1) zu der Gewebeprobe in den Mörser gegeben. (Die genau eingesetzten Mengen sind in Tabelle 6 aufgelistet.) Das Gemisch wurde dann für circa drei Minuten mit einem, in flüssigem Stickstoff vorgekühlten, Stößel zu einem feinen Puder zermahlen. Dieser Puder wurde sorgfältig in ein Eppendorfgefäß verbracht und eine nach dem Gewicht der pulverförmigen Probe berechnete Anzahl an Glaskugeln sowie Proteaseinhibitor (H2) wurden zugegeben. Die Proben wurden dann in dem Eppendorfgefäß auf ca. 4°C erwärmt und in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschallbad getaucht. Dort wurden sie in sechs Intervallen von jeweils zehn Sekunden mit Ultraschall behandelt. Um eine zu starke Erhitzung der Proben durch die Ultraschallbehandlung zu vermeiden, wurden sie zwischen den Beschallungsintervallen mit Hilfe eines dünnen Platindrahtes für zwanzig Sekunden umgerührt und dann für weitere 90 Sekunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Glaskugeln wieder aus den Proben entfernt indem diese in ein neues Eppendorfgefäß abzentrifugiert wurden. Hierfür wurden zunächst Löcher in den Boden der Eppendorfgefäße mit der Probe gestochen, die Gefäße wurden dann auf leere Eppendorfgefäße aufgesteckt und in eine auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge gegeben. Dort wurden die Proben durch eine einminütige Zentrifugation bei 3500 Umdrehungen pro Minute in die leeren Eppendorfgefäße abzentrifugiert. Um DNA-gebundene Proteine zu lösen wurden die Proben danach mit einer Magnesiumlösung und Benzonase versetzt und für fünfzehn Minuten bei 4°C gerührt. Nun wurden die Proben mit Harnstoff und Thioharnstoff versetzt und (für circa dreißig Minuten) bei Raumtemperatur gerührt, bis eine klare, homogene Lösung entstanden war. Diese wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 6: Protokoll für die Proteinextraktion

Puffer/ Lösung/ Chemikalie	Eingesetzte Menge
Probenpuffer (P)	Gewebeprobe (G) in mg x 1,6 <u>oder</u> embryonale Gewebeprobe (G) in mg x 1,0
Proteaseinhibitorlösung (H1)	$\sum_1 (G + P) \times 0,08$
Proteaseinhibitorlösung (H2)	$\sum_1 \times 0,02$
Glaskugeln	$\sum_2 (\sum_1 + H1 + H2) \times 0,02$
Magnesiumlösung (M)	$\sum_2 \times 0,025$
Benzonase (B)	$\sum_2 \times 0,021$
Harnstoff	$\sum_3 (\sum_2 + M + B) \times 0,78$
Thioharnstoff	$\sum_3 \times 0,3$

Für die Proteinextraktion aus embryonalem Gehirngewebe wurde das oben aufgeführte Protokoll leicht abgewandelt. Aufgrund der geringen Probenmenge wurden die Embryoköpfe mit Hilfe eines genau an das Gefäß angepassten Glaspistills (zurechtgefeilte Glasstäbe aus eigener Herstellung) im Eppendorfgefäß gemörsert. Das Eppendorfgefäß sowie der Pistill wurden hierfür in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Es wurde weiterhin aufgrund des höheren Wassergehaltes im embryonalen Gewebe eine geringere Menge an Probenpuffer zu dem Gewebe gegeben und für die Ultraschallbehandlung wurden kleinere Glaskugeln (Durchmesser 0,11 mm) verwendet. Die Ultraschallbehandlung erfolgte in nur vier Intervallen von je zehn Sekunden. Pro Embryonalstadium wurden zwei Proteinextrakte, die jeweils aus zwölf Embryoköpfen bestanden, angefertigt.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Proteinextrakte wurden mit Hilfe der Roti[®]-Nanoquant Lösung nach Angaben des Herstellers bestimmt. Bei jeder Messung wurde zunächst eine BSA-Standardreihe (BSA-Konzentrationen von 0, 3, 5, 7, 10, 20, und 40 ng/μl) für die Erstellung einer Kalibriergeraden hergestellt. Um die BSA-Stammlösung (BSA-Konzentration 2μg/ μl) den Proteinproben so gut wie möglich anzupassen, wurde sie vor der Herstellung der Standardreihe, den Proteinproben entsprechend, mit Harnstoff (6,5 M) und Thioharnstoff (2 M) versetzt. Die Proteinextrakte wurden 1:1000 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und je 300 μl der

verdünnten Proteinextrakte, sowie der Standardproben, wurden mit 1,2 ml der Roti[®]-Nanoquant Arbeitslösung (die Stammlösung wurde hierfür mit bidestilliertem Wasser 1:4 verdünnt) vermischt und für fünf Minuten inkubiert. Die Lösungen wurden dann in Plastikküvetten pipettiert. Die Absorption der Lösungen wurde mit Hilfe eines Mikrospektrometers bei einer Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen 450 nm und 590 nm gemessen. Die Mittelwerte der bei 590 nm gemessenen Werte wurden dann durch die Mittelwerte der bei 450 nm gemessenen Werte dividiert. Aus den Messwerten der BSA-Standardreihe konnte eine Kalibriergerade erstellt werden. Aus der Steigung dieser Kalibriergeraden und den Messwerten der Proteinproben konnte schließlich die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

Gehirngewebeproben wiesen stets eine Proteinkonzentration im Bereich von 16 bis 17 µg/µl auf; bei embryonalen Gehirngewebeproben wurde stets eine Proteinkonzentration von 10 bis 11 µg/µl gemessen.

2.2.4 Großgel 2D-Elektrophorese

Sowohl mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte als auch unmarkierte Proteinproben wurden mit Hilfe der hochauflösenden, Großgel 2-D-Elektrophorese (2-DE) aufgetrennt. Diese Technik wurde 1975 von Prof. Dr. Dr. Joachim Klose entwickelt und seitdem optimiert [71]. Sie wurde an anderer Stelle bereits detailliert beschrieben [72]. Die 2-DE Methode ist hoch reproduzierbar und Gel-zu-Gel-Variationen sind auf ein Minimum beschränkt. Weiterhin konnten in der Vergangenheit mit dieser Methode bis zu 10.000 so genannte „Proteinspots“ oder „Spots“ auf einem durch eine Silberfärbung erzeugten Proteinmuster eines Testisextraktes von *Mus musculus* unterschieden werden. Derart viele Spots können allerdings bis heute nur durch eine äußerst genaue manuelle Auswertung unterschieden werden. Bei einer Software-unterstützten Auswertung der Muster werden weniger Spots erfasst.

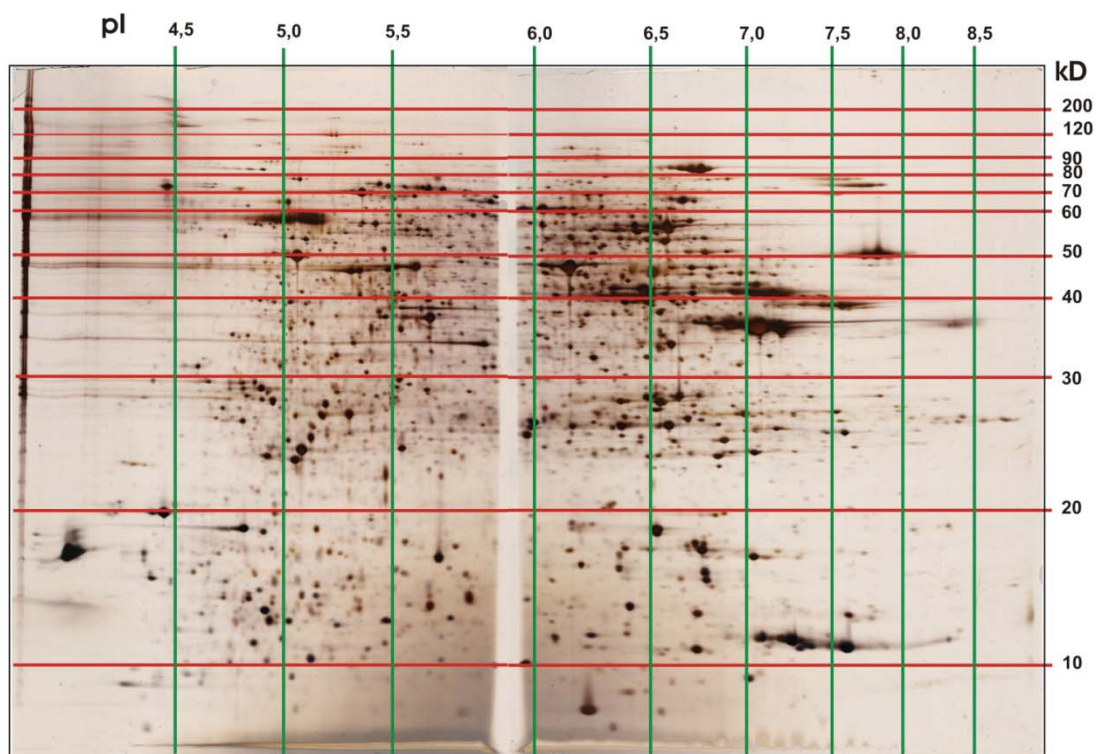
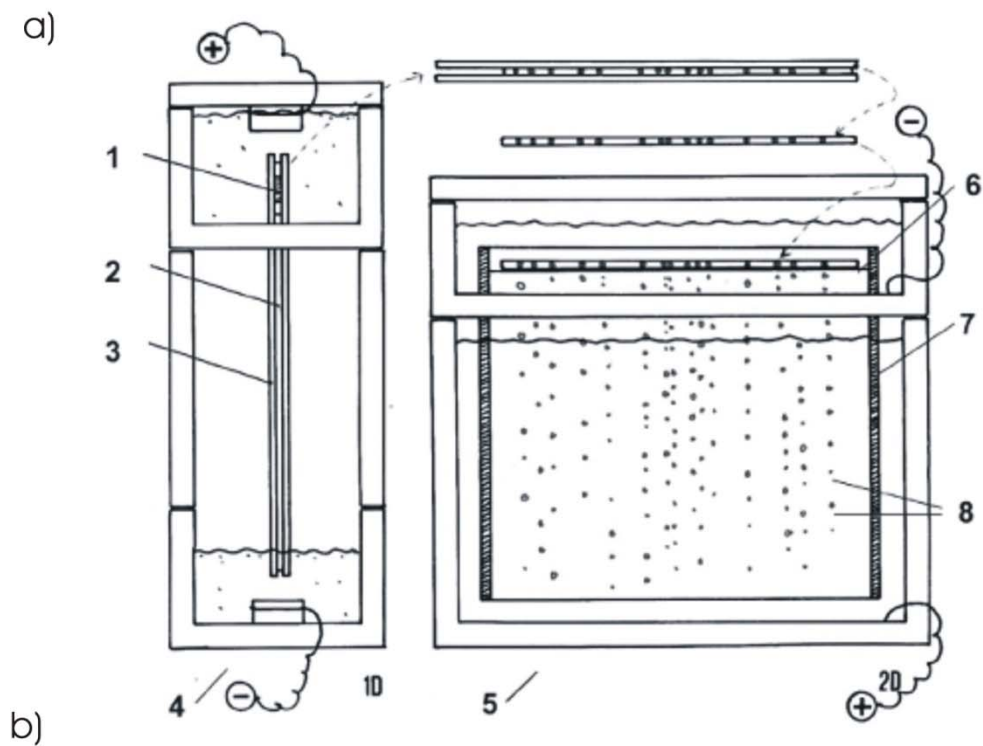


Abbildung 8: Schema der Laufkammer a) für die IEF- (links) und die SDS-PAGE-Gele (rechts), gezeigt während des jeweiligen Laufs: (1) Probe auf IEF Gel; (2) IEF Gel; (3) Glasröhrchen für die 1D; (4) Kammer für die erste Dimension (IEF); (5) Kammer für die 2D (SDS-PAGE); (6) IEF Gel aus der ersten Dimension auf dem SDS-PAGE Gel der 2D; (7) Spacer der zweiten Dimension; (8) Jeweils 2 Gele pro 2D Kammer. Ein mit Hilfe der Silberfärbung angefärbtes 2-D-Gel einer Gesamtgehirnprobe von *Mus musculus* ist in b) zu sehen. Es ist 40 cm breit und 30 cm lang. Weiterhin wird es in eine saure (links) und eine basische Hälfte (rechts) geteilt. Die pI-Bereiche der im Gel aufgetrennten Proteine (pH 4,5 bis 8,5; grüne Unterteilung) sowie deren Molekulargewichtsverteilung (10 bis 200 Kilodalton, rote Unterteilung) sind auf dem Gel eingezeichnet.

Prinzipiell trennt man bei der 2-DE Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Proteinprobe wird zunächst in der ersten Dimension einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) unterzogen. Hierfür wurde die „Carrier Ampholyte“-Technik angewandt. Dabei wird eine Spannung über ein in einem Glasröhrchen befindliches Gel angelegt und es bildet sich langsam ein pH-Gradient über das Gel aus. Die Proteine aus der Gemischprobe wandern nun gemäß ihres isoelektrischen Punktes (hier ist die Nettoladung des Proteins gleich Null) an die Stelle des Gels, an der der entsprechende pH-Wert vorliegt.

Nach der Fokussierung wird das Gel aus dem Glasröhrchen ausgestoßen und mit einer SDS-Lösung inkubiert um eine negative Ladung der Proteine durch die Bindung der negativ geladenen SDS-Moleküle zu erzeugen. Dies ist die Voraussetzung für das Auftrennen des Proteingemisches nach dem Molekulargewicht (beziehungsweise der Ladung) der Proteine in der folgenden zweiten Dimension, der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei wird das IEF- Gel, das die geladenen Proteine enthält auf ein Trenngel (Polyacrylamidgel) aufgebracht. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die Proteine dann gemäß ihrer Ladung unterschiedlich schnell in Richtung der Kathode durch das Gel. Der apparative Aufbau der 2-DE sowie ein 2-DE-Spotmuster sind in Abbildung 8 dargestellt, im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsabläufe der 2-DE genauer erläutert. Anzumerken ist noch, dass alle eingesetzten Gellösungen von der wissenschaftlichen Assistentin Frau Yvonne Kläre, angesetzt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren und gelagert wurden. Die Gellösungen wurden hierfür zuvor für eine Stunde mit einem Ionenaustauscher (18g/l) behandelt um unvernetzte Acrylamidmonomere zu entfernen. Frau Kläre prüfte weiterhin jeden ihrer Gellösungsansätze indem sie eine Standardproteinprobe mittels einer 2-DE auftrennte und das erzeugte Proteinmuster (durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht) mit Standardmustern der vergangenen Ansätze verglich. Dies diente der Optimierung der Reproduzierbarkeit.

2.2.4.1 Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Zur Herstellung eines IEF-Gels wurden zylindrische Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 44,8 cm verwendet. Die Glasröhrchen mußten vor dem Einbringen der Gellösung innen sorgfältig gesäubert werden um eine gleichmäßige Anhaftung des Gels an das Glas zu gewährleisten und um Kontaminationen mit Fremdproteinen zu vermeiden. Zur Reinigung wurden die Röhrchen zunächst in einer

50°C heißen Reinigungslösung und anschließend in einer 90°C heißen 0,1 M HCl-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit destilliertem Wasser gespült und durch Druckluft getrocknet.

Zum Giessen der Gele wurden die gereinigten Glasröhrchen in einen Ständer eingespannt. Die IEF-Gellösungen wurden aufgetaut und für fünfzehn Minuten bei 30°C inkubiert um den enthaltenen Harnstoff zu lösen. Bei Bedarf wurde die Lösung etwas geschwenkt um ungelösten Harnstoff in Lösung zu bringen. Danach wurden die Lösungen für fünf Minuten mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast und bis zur Weiterverarbeitung (die sogleich erfolgte) wieder bei 30°C gelagert. Die Trenngellösung wurde mit Ammoniumpersulfat (APS) versetzt und mittels einer über einen Gummischlauch dicht aufsitzenden Spritze bis zu einer vorher angebrachten Markierung in das Glasröhrchen aufgezogen. Nun wurde sogleich die Capgellösung mit APS versetzt und bis zu einer zweiten Markierung in das Röhrchen aufgezogen. Die Capgellösung dient dem Auffangen der Proteine mit sehr basischem pI am Ende des Gels. Sie besitzt eine sehr hohe Acrylamidkonzentration und verhindert so ein „Auslaufen“ dieser Proteine bei der IEF. Die Röhrchen wurden dann an der Seite, an der die Lösungen aufgezogen wurden, mit Filterpapier von Tropfen befreit und dann bis zu einer dritten Markierung auf den Röhrchen weitergezogen, so dass nun am unteren und oberen Ende des Gels ein gewisses Luftvolumen vorhanden war. Alle Lösungen wurden luftblasenfrei in die Röhrchen gezogen und die Gele wurden nach dem Giessen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach waren sie weitgehend auspolymerisiert. Die Gießhilfen (Nylonfaden oder Spritze) wurden dann entfernt und mit Hilfe einer ausgezogenen Glaspipette wurde etwas destilliertes H₂O in das obere und untere Ende des Glasröhrchens gegeben (zwischen dem Gel und dem Wasser mußte immer eine Luftblase frei bleiben), um ein Austrocknen der Gele durch die weitere Lagerung zu vermeiden. Die Röhrchenenden wurden weiterhin zum Schutz der Gele mit Parafilm M[®] verschlossen. Um ein vollständiges Auspolymerisieren der Gele zu gewährleisten wurden diese noch für dreißig Minuten bei 30°C inkubiert und dann bei Raumtemperatur bis zu ihrem Gebrauch (innerhalb der nächsten vier Wochen) gelagert. Die Länge der Gele betrug nach dem Giessen genau vierzig Zentimeter.

Für die IEF wurden zunächst, je nach Bedarf, zwei bis sechs Gelröhrchen in die IEF- Elektrophoresekammer mit der Capgelseite nach unten eingespannt. Die untere Kammer (Kathodenkammer) der Elektrophoreseapparatur wurde mit 400 ml entgastem (fünf Minuten Entgasungszeit) Kathodenpuffer befüllt. Das Wasser in der Aussparung am Unterende (Capgelende) der Gelröhrchen wurde abgesaugt. Dann wurde luftblasenfrei Kathodenpuffer in die Aussparung gegeben, bevor die Röhrchen in die Ethylendiaminlösung eingetaucht wurden. Anschließend wurde das obere Ende der Gellösung von Wasser befreit. Mit Hilfe einer ausgezogenen Glaspipette wurde dann eine circa drei Millimeter dicke Schicht einer Sephadexlösung luftblasenfrei auf das obere Gel-Ende aufgebracht. Die zähe Sephadexschicht diente zum Auffangen von Proteinen die zu Beginn der IEF, also einem Zeitpunkt, an dem sich die Proteine in hoher Konzentration am Gel-Anfang befinden präzipitieren oder aggregieren. So wurde ein Verstopfen des Gel-Anfangs verhindert. Die Proteinproben wurden nun aufgetaut und, wenn nicht bereits geschehen, mit DTT (Konzentration in der Probe: 70 mM) und einer Servalytlösung (eingesetzte Menge in µl = 0,1 x Gewicht der Probe in mg) versetzt. Die jeweils gewünschte Probenmenge (eine komplette, mit Cy3/Cy5 markierte Probe, beziehungsweise bei Gelen, die dem Ausstechen und Identifizieren von Proteinspots dienten, 40 µl einer Gewebeprobe) wurden mit Hilfe von Hamilton[®]-Spritzen blasenfrei auf die Sephadexlösung aufgebracht. Um die Proben vor einer Präzipitation bei Kontakt mit dem

sauren Anodenpuffer zu schützen, wurde auf die Probe noch eine circa fünf Millimeter dicke Schicht einer Schutzlösung luftblasenfrei aufgetragen, bevor das Röhrchen bis zur Oberkante mit Anodenpuffer luftblasenfrei aufgefüllt wurde. Der Anodenpuffer wurde schließlich auch in die obere Laufkammer (Anodenkammer) so eingefüllt, dass die Gelröhrchen komplett mit Puffer bedeckt waren.

Die IEF-Apparatur wurde schließlich an der oberen Laufkammer mit der Anode und an der unteren Laufkammer mit der Kathode des Spannungsgerätes verbunden und durch das Anlegen der Spannung gestartet. Das Spannungsgerät wurde dabei auf eine schrittweise Spannungszunahme programmiert. Das genaue Programm ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Programm für den IEF-Lauf der Gele

Schritt	Programm (Großgeltechnik, 40 cm lang; Ø 1,5 mm)
1	100 V, 1 h
2	300 V, 1 h
3	1000 V, 23 h
4	1500 V, 30 Min
5	2000 V, 10 Min

Nach Ende des Gellaufs wurden die Gele mit Hilfe einer, mit bidestilliertem Wasser gefüllten Spritze aus dem Glasröhrchen auf eine Plastikschiene ausgestoßen. Die Gele wurden nach genau zwanzig Zentimetern durchtrennt, so dass nun zwei Gelteile vorlagen die, je nach enthaltenem pH-Bereich als „saure“ (pH 3 bis 7) und „basische“ (pH 7 bis 9) Seite eines Gels bezeichnet wurden. Sie wurden auf zwei getrennte, entsprechend beschriftete Schienen aufgelegt. Auf diese Schienen wurde weiterhin eine SDS-haltige Inkubationslösung aufgetragen. Das SDS sollte nun den proteinassoziierten Harnstoff ersetzen, die Gele wurden so auf die zweite Dimension der 2-DE vorbereitet. Die Gele wurden jedoch zunächst bis zum Zeitpunkt des Laufes der zweiten Dimension, mindestens aber für eine Nacht bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.4.2 Die zweite Dimension: SDS-PAGE

Wie bei der IEF wurde auch im Falle der in der zweiten Dimension verwendeten Glasplatten, auf Sauberkeit geachtet. Jeder, an der Glasplatte anhaftende Partikel hätte ein Verschmieren der an dieser Stelle im Gel aufgetrennten Proteinproben verursacht. Um die 28 cm langen und 25 cm breiten Glasplatten zu reinigen, wurden diese nach Entfernen des Gels zunächst für 24 Stunden in einer 0,1 M NaCl-Lösung inkubiert. Dann

wurden sie unter Verwendung eines Haushaltsscheuermittels geputzt. Das Scheuermittel wurde anschließend äußerst sorgfältig mit destilliertem Wasser abgewaschen. Danach wurden die Glasplatten zum Trocknen in eine Halterung gestellt. Vor dem Giessen der Gele wurden die Glasplatten erst mit 70% (v/v) Ethanol (in bidestilliertem Wasser) und dann mit 100% Ethanol unter Verwendung von weitgehend fusselfreien Papiertüchern abgewischt. Für das Gießen von Gelen in denen fluoreszenzmarkierte Proteinproben aufgetrennt wurden, wurden die Platten noch in einem dritten Schritt mit unvergälltem Ethanol abgewischt, da der vergällte Ethanol fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Es wurden dann je zwei Glasplatten aufeinander gelegt. Am linken und rechten äußersten Rand der unteren Glasplatte wurde hierfür zuvor ein von beiden Seiten mit Silikonfett bestrichener Abstandshalter aufgelegt. Er hatte eine definierte Dicke von 1,5 mm. Die so präparierten Glasplatten wurden auf den beiden Seiten, an denen die Abstandshalter eingelegt waren, mit Plastikklammern fest miteinander verbunden und in eine Gießapparatur eingespannt. Die gesamte Apparatur wurde auf ihren waagerechten Stand hin überprüft. Dann wurden die Gellösungen, die zuvor für 30 Minuten bei 40°C aufgetaut worden waren, mit APS versetzt. Um eine Aussparung für das Auftragen des IEF-Gels zu erzeugen, wurden von unten zwei Milliliter Unterschichtungslösung zwischen die Glasplatten gespritzt. Die Gellösung wurde nun von oben zwischen die beiden Glasplatten eingegossen und mit Hilfe eines Metalldrahtes wurden Luftblasen aus dem eingegossenen Gel entfernt. Bei Raumtemperatur wurden die Gele für 1,5 Stunden inkubiert, bis sie vollständig auspolymerisiert waren. Sie wurden dann aus der Gießapparatur entnommen und das Glycerin wurde mit einer kleinen Menge des Laufpuffers sorgfältig von der Geloberfläche abgewaschen. Die Gele wurden dann bis zu ihrer Verwendung über Nacht bei 4°C gelagert, zum Schutz der Gele wurden die Glasplatten an den offenen Enden mit Parafilm umwickelt.

Vor dem Lauf der zweiten Dimension wurden die IEF-Gele aufgetaut und von Pufferresten befreit. Sie wurden dann vorsichtig von der Schiene in den Auftragsspalt und auf das Trenngel aufgebracht. Hierbei war besonders zu beachten, dass die Gele luftblasenfrei und ohne Streckung aufgebracht wurden. Um ein Ablösen der IEF-Gele von der Trenngeloberfläche zu vermeiden, wurde eine Agaroselösung über das IEF-Gel in den Auftragsspalt aufgetragen. Die Agarose polymerisierte bei Raumtemperatur sogleich aus, so dass sie eine feste Schutzschicht über dem IEF- Gel bildete. Außerdem enthielt sie Bromphenolblau das später, während des Gellaufes eine blau gefärbte Lauffront bildete, die den Fortschritt der Elektrophorese anzeigte. Die Gele wurden in die Laufkammern überführt und die obere Pufferkammer (Kathodenkammer) wurde mit dem Kathodenpuffer gefüllt. Auch die untere Pufferkammer (Anodenkammer) wurde mit Anodenpuffer gefüllt. Die Laufkammern waren mit einer Umwälzpumpe, die den unteren Laufpuffer umwälzte und einer in der Anodenkammer befindlichen Kühlspirale versehen, um ein Erhitzen des Gels während des Laufs zu verhindern. Kathoden- und Anodenkammer wurden mit dem Spannungsgerät verbunden und es wurde zunächst für fünfzehn Minuten eine Spannung von 85 V angelegt. Danach wurde für den Rest der Elektrophorese eine Spannung von 120 V angelegt, die Elektrophorese war beendet sobald die blaue Lauffront (nach circa fünf Stunden) bei einer am unteren Glasrand angebrachten Markierung angekommen war. Generell wurden immer zwei Gele in einer Laufkammer der Elektrophorese unterzogen, hierbei wurden immer die vorher festgelegten Probenpaare in einer Kammer aufgetrennt, um Laufunterschiede zu minimieren.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele entweder zwischen den Glasplatten belassen und eingescannt (bei fluoreszenzmarkierten Proben) oder vorsichtig von den Glasplatten abgehoben und in eine Fixierlösung gegeben, in der sie dann über Nacht bei Raumtemperatur oder bis zu vier Tage lang bei 4°C inkubiert wurden.

2.2.5 Silberfärbung von 2-D-Gelen

Um Proteine in 2-D-Gelen anzufärben wurde eine saure Silberfärbung durchgeführt. Sie wurden bereits an anderer Stelle intensiv beschrieben [72,73]. Hier kamen zwei Methoden zum Einsatz. Im einen Falle wurden die Gele so gefärbt, dass möglichst viele Proteinspots sichtbar wurden. Im anderen Falle (MS-Färbung) wurden die Gele so gefärbt, dass eine spätere Identifizierung aus dem Gel ausgestochener Proteinspots möglich war. Dies war möglich, da hier die Chemikalie Glutaraldehyd, die eine Quervernetzung der Proteine bewirkt, nicht zum Einsatz kam.

Allgemein wurden Gele angefärbt, die zuvor fixiert worden waren, um Substanzen wie SDS oder Glycin, die die Färbung stören würden, zu entfernen. Danach wurden alle Gele einzeln in geeigneten Wannen mit den entsprechenden Lösungen auf einem langsam hin und herschwenkenden Schüttler inkubiert. Für einen Wechsel der Lösungen wurden die Gele von einer Wanne in eine andere Wanne, die eine andere Lösung enthielt, überführt. Alternativ wurde die zu entfernende Lösung abgesaugt und eine neue Lösung in die Wanne eingefüllt. Letztere Methode kam nach der Inkubation der Gele mit der Silbernitratlösung zum Einsatz, da die Gele an dieser Stelle sehr reißempfindlich sind.

Für die normale Silberfärbung wurden die Gele zunächst aus der Fixierlösung genommen und dann für zwei Stunden in der Inkubationslösung inkubiert. Danach wurden die Gele zweimal für zwanzig Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt und dann für dreißig Minuten in der Silberlösung inkubiert. Nach dem Absaugen der Silberlösung wurden die Gele für einige Sekunden in destilliertem Wasser geschwenkt. Danach wurden die Gele für eine Minute in der Spüllösung inkubiert und anschließend durch Eingießen der Entwicklerlösung entwickelt. Die Gele wurden für circa sechs Minuten entwickelt, bis ihr Färbegrad genau einer Vorlage (ein silbergefärbtes Gel) entsprach. Dann wurde die Entwicklerlösung abgesaugt und der Färbeprozess wurde durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Die Gele wurden für mindestens zwanzig Minuten in der Stopplösung inkubiert, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

Die MS-Färbung wich in einigen Punkten von der normalen Silberfärbung ab. Nach der Fixierung wurden die Gele zunächst für zehn Minuten in einer Ethanollösung (30% Ethanol in destilliertem Wasser) und anschließend für eine Minute in einer Thiosulfatlösung (0,02% Na-Thiosulfat (w/v) in destilliertem Wasser) inkubiert. Danach wurden die Gele zweimal für eine Minute in destilliertem Wasser geschwenkt bevor sie für dreißig Minuten in der Silberlösung inkubiert wurden. Die hier verwendete Silberlösung beinhaltete kein Formalin und enthielt eine Silbernitratkonzentration von 0,15%. Danach wurden die Gele wie oben beschrieben, gewässert, gespült, entwickelt und in der Stopplösung inkubiert. Die Zusammensetzung der Entwickler- sowie der Stopplösung wich

von dem normalen Rezept ab. Die Entwicklerlösung enthielt zusätzlich 0,02% Natriumhydrogencarbonat und 0,025% Thimerosal. Die Stopplösung enthielt kein Thimerosal. Nach dem Stoppvorgang wurden die Gele mit destilliertem Wasser gewaschen, in eine Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

2.2.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen (*Saturation labelling*)

Neben der Silberfärbung der 2-D-Gele wurde die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen angewandt um die im Gel aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Im Gegensatz zu der Silberfärbung werden hier die Proteine bereits vor dem Gellauf mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Im Falle des so genannten „*Saturation labelling*“ wurde der Farbstoff Cy3 verwendet. Er trägt reaktive Maleimidgruppen, die mit den Thiolgruppen der Cysteinreste eine kovalente Thioetherbindung eingehen. Bei der Markierung einer Proteinprobe werden dabei alle Cysteinreste der Proteine mit je einem Farbstoffmolekül verbunden. Die markierten Proteine werden im Rahmen der 2-DE aufgetrennt. Das Spotmuster kann dann mit Hilfe eines Laserscanners eingescannt werden. Allgemein ist diese Methode sehr sensitiv.

Im Detail wurden 0,5 µl der Proteinproben (embryonaler Gehirnextrakt) mit 9,5 µl Probenpuffer und einem µl TCEP-Lösung vermischt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert, um die Disulfidbrückenbindungen der Cysteinreste zu lösen. Danach wurden 2 µl des der Fluoreszenzfarbstoffs (2 mM Cy3), der zuvor mit frischem DMF verdünnt wurde, zugegeben. Die Proben wurden erneut bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde danach durch Zugabe der Stopplösung gestoppt. Die markierten Proteinproben wurden bis zur Weiterverwendung bei -70°C eingefroren und gelagert. Allgemein wurden alle Arbeitsschritte ab Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden.

2.2.7 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE)

Die *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* (DIGE) ist eine relativ neue Methode, die erheblich zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit der 2-DE beigetragen hat [74]. Sie basiert auf einem wirkungsvollen Prinzip. Durch den Einsatz von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3 und Cy5), die über reaktive N-Hydroxy-Succinimid-Estergruppen eine kovalente Amidbindung an die ε- Aminogruppe der Lysinreste von Proteinen ausbilden, können bis zu drei Proteinproben in einem 2-D-Gel aufgetrennt werden. Die verschiedenen Proteinproben werden vor dem Gellauf jeweils mit einem der drei Farbstoffe gekoppelt, anschließend können die Proben zu einer Probe zusammengemischt werden. Die Probe wird dann in einem 2-D-Gel aufgetrennt. Die drei Ursprungsproben können anschließend wieder unterschieden werden. Hierfür wird das 2-D-Gel auf einen geeigneten Laserscanner aufgelegt. Da die drei Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen besitzen, können nun die Proteinmuster der drei Ursprungsproben durch Anregung mit der individuellen Wellenlänge des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes abgescannt werden. Der Vorteil dieser Methode beruht darin, dass durch die Tatsache, dass zu vergleichende Proben in demselben Gel aufgetrennt wurden, Gel-zu-Gel-Variationen der Proteinmuster, die sich negativ auf die Vergleichbarkeit der

Muster auswirken, umgangen werden. Durch das nahezu identische Molekulargewicht (ca. 500 Da) der drei Farbstoffe nehmen die markierten Proteine aus allen drei Proben exakt dieselbe Lage auf dem 2-D-Muster ein. Die aus den drei Ursprungsproben entstandenen 2-D-Muster können also exakt aufeinander gepasst werden, Laufunterschiede und eine daraus resultierende Lageverschiebung der aus dem 2-D-Muster sichtbaren Proteinspots sind ausgeschlossen. Weiterhin besitzen die Fluoreszenzfarbstoffe gegenüber einer herkömmlichen Silberfärbung der Gele den Vorteil, dass sie einen großen linearen Bereich abdecken, eine Quantifizierung der Spotintensitäten wird hierdurch genauer.

2.2.7.1 Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen (Minimal labelling)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinproben nur mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Diese so genannten „*minimal dyes*“ wurden in einer auf den Proteingehalt der Probe so abgestimmten Konzentration und einer genau definierten Reaktionszeit eingesetzt, dass nur ca. 2% der in der Proteinprobe enthaltenen Lysinreste mit einem Farbstoffmolekül gekoppelt wurden. Dies bedeutet, dass pro in der Probe enthaltener Polypeptidkette nur circa eine Lysingruppe mit einem Farbstoffmolekül gekoppelt wurde. Diese Methode hatte den Vorteil, dass durch den geringen Einsatz des Farbstoffes eine Identifizierung der Proteine durch massenspektrometrische Methoden nicht beeinträchtigt wird. Weiterhin konnte so der Verbrauch der sehr teuren Fluoreszenzfarbstoffe auf ein Minimum beschränkt werden. Da jedes Cy-Molekül nur ca. 500 Kilodalton zum Molekulargewicht eines Proteins addiert, verändert sich dessen Lage im 2-D-Gel nur unwesentlich. Weiterhin sind die Cy-Moleküle positiv geladen. Somit wird der Verlust der positiven Ladung des Lysinrestes durch die Bindung des Cy-Moleküls ausgeglichen. Die Markierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Markierung wurden die Proteinproben zunächst aufgetaut. Dann wurde eine Proteinmenge von 50 µg (70 µg bei embryonalen Gewebeproben) mit Markierungspuffer so verdünnt, dass eine Proteinkonzentration von 10 µg/µl erreicht wurde, da sich diese Konzentration für den Markierungsprozess als ideal erwiesen hatte (genaue Angaben zu den eingesetzten Mengen für den Markierungsprozess sind in Tabelle 3 aufgeführt). Weiterhin konnte so gewährleistet werden, dass die Proteinprobe einen pH-Wert von 8,0 bis 9,0 aufwies, was für den Ablauf der Bindungsreaktion zwischen Farbstoff und Proteinen essentiell ist. Um den Farbstoff, der in lyophilisierter Form geliefert wurde, wieder in Lösung zu bringen wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, aus der jeweils die für die Probenmenge benötigte Menge an Farbstoff entnommen und für die Markierungsreaktion weiter verdünnt wurde. Allgemein wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit qualitativ hochwertigem, wasserfreiem Dimethylformamid verdünnt. Hierbei war zu beachten, dass das DMF stets frisch und nicht älter als drei Monate war, da es nach Öffnung mit der Zeit unter der Bildung von Aminen abgebaut wird. Diese Amine würden bei der Markierung an Farbstoffmoleküle binden und somit eine geringere Markierungsrate der Proteine bewirken. Die lyophilisierten Farbstoffe wurden mit DMF auf eine 1 mM Stammlösung verdünnt. Diese Stammlösung wurde stets möglichst im Dunkeln verarbeitet und gelagert, da Licht ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe bewirkt. Dies galt auch für alle weiteren Schritte des

Markierungsprozesses sowie die spätere 2-DE. Die Stammlösung wurde bei -15°C gelagert. Für die Markierung der Proteine wurde sie mit DMF auf 400pmol/µl verdünnt. Nun wurden 400pmol (für embryonale Gehirngewebeproben 560 pmol) der Farbstoffe zu 50µg (beziehungsweise 70 µg) der Proteinproben gegeben, mit ihr vermischt und im Dunkeln bei 4°C für genau 10 Minuten inkubiert. Dabei wurde je eine Probe mit Cy3 markiert und eine zugehörige Standardprobe mit Cy5 markiert. Dann wurde die Markierungsreaktion durch das Hinzufügen von 1 µl (1,4 µl bei embryonalen Proben) einer 10 mM Lysinlösung gestoppt. Das Lysin diente hierbei dem Abfangen ungebundener Farbstoffmoleküle. Die Proben wurden mit der Lysinlösung vermischt und für 15 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Dann wurde jeweils eine mit Cy3 markierte Probe mit der zugehörigen mit Cy5 markierten Standardprobe zu einer Probe vermischt. Nun wurden die Proben bis zur Auftrennung durch die 2-DE bei -80°C für maximal zwei Wochen gelagert.

2.2.7.2 Einscannen der fluoreszenzmarkierten Proteinmuster

Nachdem die Proteinproben markiert worden waren wurden sie mit Hilfe der 2-DE aufgetrennt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe mußte bei der 2-DE beachtet werden, dass während des gesamten Prozesses die Lichtintensität auf ein Minimum reduziert wurde. Dies geschah indem Laufkammern mit Aluminiumfolie abgedeckt wurden und die Gele nach der 2-DE in lichtundurchlässigen Behältnissen transportiert und gelagert wurden. Nach der 2-DE wurden die Gele, die sich zwischen zwei gesäuberten Glasplatten befanden, nacheinander auf die Scannfläche eines Laserscanners aufgelegt. Die Proteinmuster wurden dann bei einer Auflösung von 100 dpi nach Herstellerangaben eingescannt.

Nach dem Einscannen wurden die Proteinmuster digital zurechtgeschnitten, so dass die Abstandshalter an beiden Seiten, sowie die Linie der unteren Lauffront von dem Bild entfernt waren. Weiterhin konnte hier die Orientierung der Bilder überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

2.2.8 Auswertung der Proteinmuster

Die digitalisierten Proteinmuster wurden nach dem Einscannen mit Hilfe der Auswertesoftware *Delta2D* (Version 3.4,[75]) ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte größtenteils gemäß den Benutzerhinweisen zu *Delta2D*. Bildlich erklärt erfolgte die Auswertung mit *Delta2D* so, dass zunächst alle Spotmuster in eine Matrix integriert wurden. Anhand dieser Matrix wurden dann nach und nach alle Spotmuster virtuell zur Deckung gebracht. Hierfür wurden immer zwei Spotmuster übereinanderprojiziert und dann global und lokal so lange gestreckt oder gestaucht, bis sie perfekt übereinander passten. Dieser Prozess, das Matching, erfolgte durch das Setzen von mehreren hundert Vektoren, den Matchvektoren (Abbildung 9a). Auf diese Weise wurden schließlich alle Spotmuster aus einem Projekt zur Deckung gebracht (Abbildung 9b). Danach erfolgte die Spotdetektion. Hierbei errechnete die Software Umrisse zu allen auf einem Spotmuster erkennbaren Proteinspots. Nach einer manuellen Korrektur dieser Spotumrisse, wurden die Umrisse aller detektierten Spots auf alle im Projekt befindlichen Spotmuster übertragen (Abbildung

9c). Daraufhin wurde eine Liste aller Spots erstellt. In dieser Liste erschien zu jedem Spot das jeweils errechnete Volumen des Spots (Grundfläche x Intensität = Volumen) auf den verschiedenen Spotmustern. Diese Liste diente später der statistischen Auswertung, die mit Hilfe der Software *SPSS* (Version 13.0, SPSS Inc, Chicago IL, USA) durchgeführt wurde. Bei einem Vergleich zweier Gruppen wurde der zweiseitiger Student t-Test (gepaart bei Probenpaaren oder homoskedastisch) durchgeführt. Bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen wurde eine einfaktorielle *Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschliessendem Posthoc-Test nach Bonferroni durchgeführt.

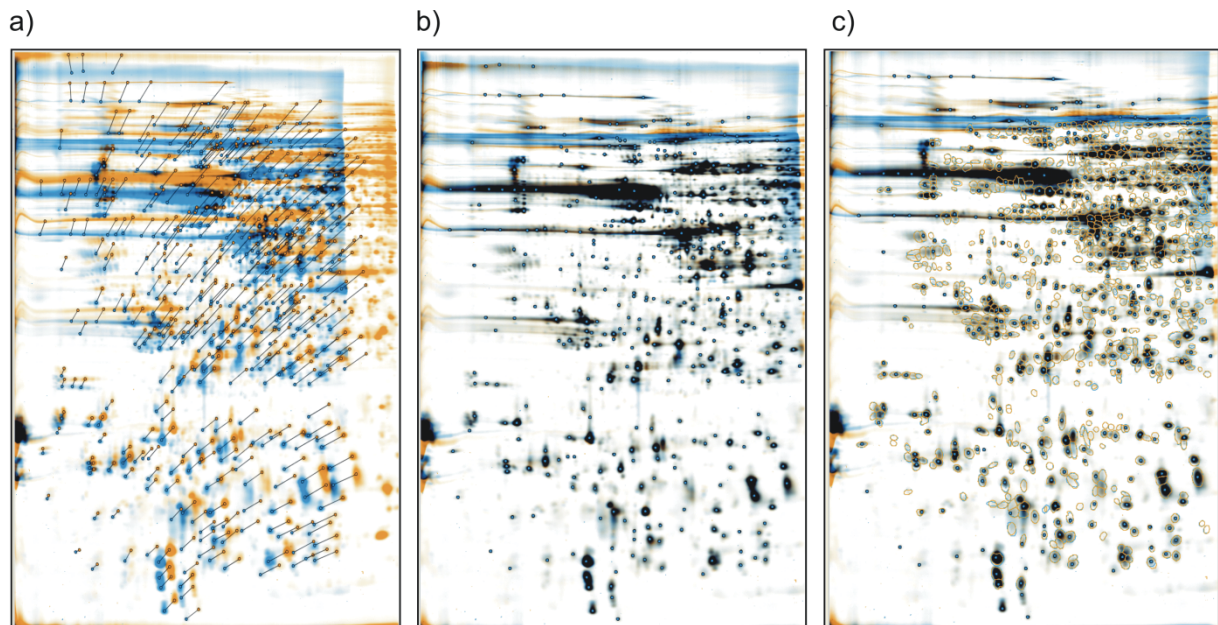


Abbildung 9: Der Auswerteprozess mit *Delta2D*. In a) sind zwei Spotmuster zu sehen, eines ist orange, das andere ist blau gefärbt. Mit Hilfe von Matchvektoren (Linien) werden die Muster beider Gele zur Deckung gebracht. In b) sind beide Spotmuster als Überlagerungsbild gezeigt. Nach dem Matchingprozess passen die Muster perfekt übereinander und die orangenen und blauen Spots ergeben übereinander gelegt schwarze Spots. In c) sind bereits die editierten Spotumrandungen auf dem Überlagerungsmuster zu sehen.

Für die Auswertung der mittels der DIGE-Methode erstellten Proteinmuster kam eine besondere Art der Auswertung zur Anwendung (Abbildung 10). Da hier in jedem Gel zwei Proben, eine Standardprobe und eine analytische Probe, aufgetrennt wurden, waren auch pro Gel zwei perfekt übereinander passende Spotmuster entstanden. Daher wurden in *Delta2D* immer nur die Standardmuster aufeinander gematcht. Jedes der Standardmuster passte perfekt auf ein analytisches Muster und diese Information konnte direkt genutzt werden.

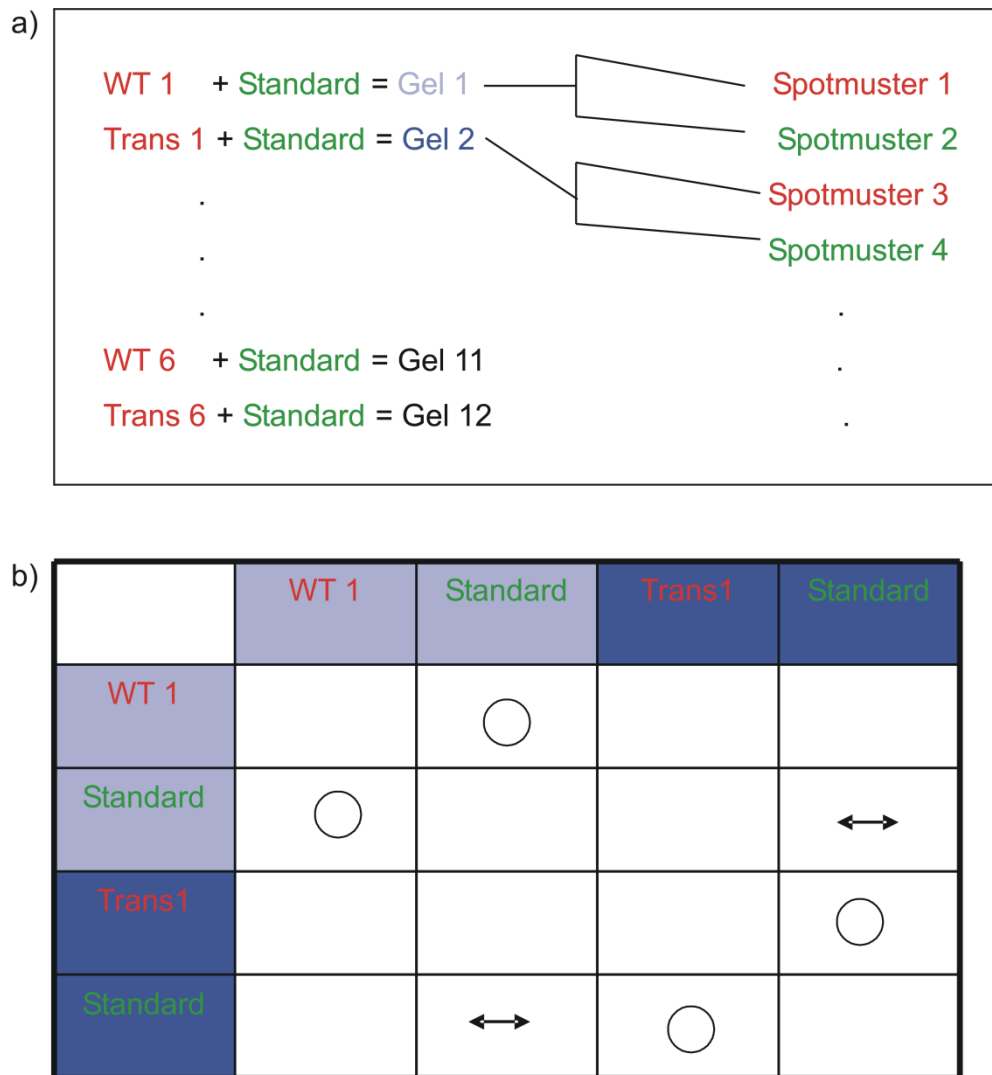


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Auswertung von DIGE-Experimenten. Im Zuge der 2-DE werden die analytischen Proben (a), die meist von Wildtyp- (WT) oder transgenen (Trans) Mäusen stammen, jeweils mit demselben Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dies ist durch eine rote Schrift dargestellt. Zu jeder analytischen Probe wird eine Standardprobe gegeben, die mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff (grüne Schriftfarbe) markiert wurde. In einem Gel werden also jeweils eine analytische und eine Standardprobe aufgetrennt. Nach dem Einscannen der Muster können die Ursprungsproben, gemäß den verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe, wieder getrennt werden. Die Spotmuster der Standardproben werden dann mit Hilfe von *Delta2D* zur Deckung gebracht. Dies ist in b) dargestellt. In der Matrix ist mit Kreisen indiziert, dass die Muster der Proben, die in einem Gel gelaufen sind, bereits übereinander passen. Der Doppelpfeil zeigt an, welche Spotmuster noch gematcht werden müssen.

Des Weiteren dienen die Standardmuster der Normalisierung der analytischen Muster. Da jedem Standardmuster dieselbe Proteinprobe zugrunde liegt, sollten auch alle Muster identisch sein. Mit Hilfe der Gleichsetzung (Normalisierung) aller Standardmuster können Laufunterschiede und vor allem Unterschiede in der Intensität der Muster ausgeglichen werden (Abbildung 11). Die Normalisierung erfolgt durch das Gleichsetzen der Volumina

eines Spots auf den verschiedenen Standardmustern eines Projektes. Die Volumina der jeweils zugewiesenen analytischen Spots werden proportional dazu korrigiert. Durch die im Rahmen der DIGE-Methode angewandte Standardisierung wird die Reproduzierbarkeit der 2-DE deutlich verbessert.

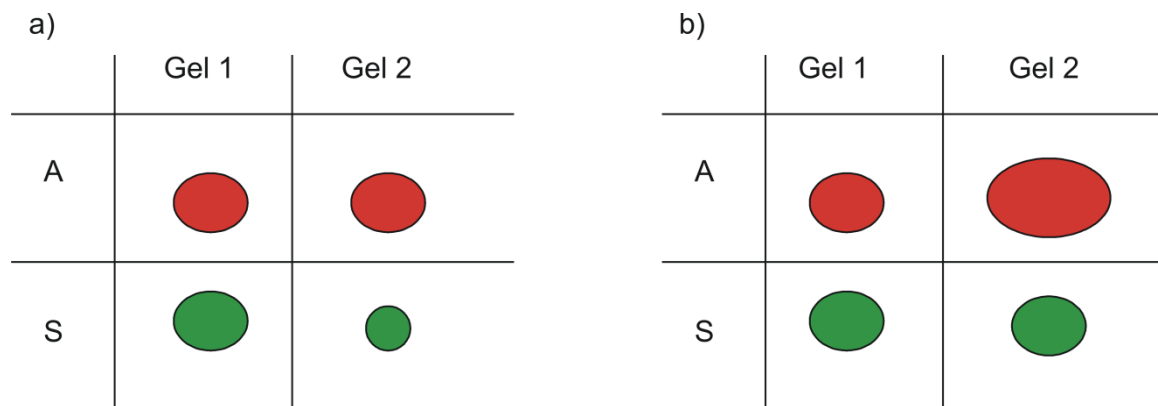


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Normalisierung durch das Standardmuster. In a) ist ein Proteinspot dargestellt, der in den zwei analytischen Proben (A, rote Spots) auf Gel 1 oder 2 gleich groß ist. Derselbe Spot ist in den, in Gel 1 oder 2 mitgelaufenen Standardproben (S, grüne Spots) unterschiedlich groß. In b) ist zu sehen, dass nach der Normalisierung der Standardproben beide Spots aus den Standardproben gleich groß sind. Proportional dazu wurde auch die Größe des roten Spots aus der analytischen Probe in Gel 2 korrigiert.

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei verschiedene Projekte mit *Delta2D* ausgewertet. Zum einen wurde die normale Embryonalentwicklung des Mausgehirns untersucht und zum anderen wurde das Gehirnproteom von transgenen Mäusen (APP23) mit dem von Wildtypmäusen verglichen. Für beide Projekte wurde eine besondere Auswertestrategie entwickelt.

Im APP23-Projekt sollten zum einen die Muster der transgenen Mäuse mit denen der Wildtypmäuse verglichen werden. Zum anderen sollten aber auch Muster verschiedener Altersstadien untereinander verglichen werden. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der Spotdetektion ein Standardmuster der Spotumrisse festgelegt, das dann auf alle Spotmuster im gesamten Projekt kopiert wurde. Hierfür wurde zunächst aus jeder Gruppe (Gruppen: Transgen, Wildtyp, bestimmtes Alter oder bestimmtes Gehirngewebe) ein Gel ausgewählt. Dann wurden alle ausgewählten Gele aufeinander gematcht und es wurde ein Fusionsmuster erzeugt. Das Fusionsmuster enthielt alle Spots aus allen gematchten Mustern. Dies ist wichtig denn so wurde sichergestellt, dass Spots die beispielsweise nur in einem bestimmten Altersstadium auftauchen, auch in die Spotdetektion miteinbezogen werden. Auf dem Fusionsmuster wurde dann die Spotdetektion durchgeführt. Das entstandene Muster an Spotumrissen wurde dann auf alle Muster in dem gesamten Projekt übertragen. Auf diese Weise konnte eine Liste erstellt werden, auf der das Volumen eines bestimmten Spots in jedem Spotmuster aus dem gesamten Projekt ersichtlich war. Das Spotmuster der detektierten Spots umfasste 1769 Spots.

Auch für die Auswertung der Embryonalentwicklung wurde auf einem Fusionsgel von Mustern aller unterschiedlichen Embryonalstadien eines Standardspotmusters erstellt. Das Fusionsmuster wurde ebenfalls auf alle Muster im Projekt kopiert.

Für die Identifizierung der Proteinspots wurden diese aus Gelen ausgestochen, die durch die MS-Silberfärbung angefärbt waren (MS-Gele). Um die Lage der Spots auf diesen Gelen eindeutig festzustellen, wurden auch die MS-Gele eingescannt und auf die fluoreszenzgefärbten Gele gematcht. Dann wurden die Spotumrandungen auf die MS-Gele übertragen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die richtigen Spots ausgestochen und identifiziert wurden.

2.2.9 Identifizierung der Proteinspots durch die Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Proteinidentifikation sowie alle mit ihr verbundenen Arbeiten (bis auf die Auswertung der ESI-MS/MS-Ergebnisse) wurden von Frau Dipl. Ing. Grit Nebrich sowie Frau Andrea Koppelstätter und Frau Silke Becker durchgeführt.

Ein Massenspektrometer besteht im Prinzip aus drei Teilen, einer Ionenquelle, einem oder mehreren Analysatoren und einem Detektor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Massenspektrometer mit unterschiedlichen Ionenquellen und Analysatoren verwendet. Ein Gerät basiert auf der *Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation* (MALDI) sowie der *Time of flight*-Analyse (TOF) und das andere auf der Electrospray-Ionisierung (ESI) mit nachgeschalteter Ionenfalle. Vor der Analyse eines Proteinspots, muss ein Verdau der im Spot enthaltenen Proteine erfolgen.

2.2.9.1 In-Gel Verdau

Um die in den ausgeschnittenen Proteinspots enthaltenen Proteine zu identifizieren, musste zunächst ein Verdau der Proteine durch eine Protease (Trypsin) erfolgen. Hierfür wurden die Gelstücke zunächst dehydriert und dann mit einem proteasehaltigen Puffer wieder rehydriert. Auf diese Weise wurde die Protease in das Gel aufgesogen und konnte dort die Proteine spalten. Anschließend wurden die Fragmente aus dem Gel ausgewaschen. Weiterhin wurden im Rahmen des Proteinverdaus störende Chemikalien wie Salze oder Detergenzien aus den Proteinproben entfernt.

Im Detail wurden die Gelstücke zunächst dreimal mit 10 µl Verdaupuffer und 10 µl modifiziertem Verdaupuffer gewaschen. Danach wurden die Gelstücke in 10 µl Azetonitril geschrumpft und in 2 µl Proteaselösung quellen gelassen. Der Verdau fand in einem Zeitraum von 3 Stunden bei 37 °C statt. Der gewonnene Überstand wurde in eine saubere Quarzküvette überführt und die Gelstücke wurden noch zwei Mal mit je 5 µl Verdaupuffer extrahiert. Die Überstände wurden gepoolt.

Im Falle einer Identifizierung der Proben mit dem MALDI-Gerät erfolgte eine Target Präparation. Zunächst wurden die Proben mit Hilfe von Poros 10 R1 Beads aufkonzentriert. Dann erfolgte die konventionelle „trockene Tropfen –Technik“. Es wurde je 1 µl Matrixlösung aufgenommen und auf ein konventionelles MALDI Target transferiert.

Eine alternative Probenaufbereitungsmethode verwendet die AnchorChip® Technologie. AnchorChips® sind mit hydrophilen Patches („Anker“) in einer hydrophoben Umgebung ausgestattet, so dass der relativ hydrophile Analyt sich auf den „Ankern“ konzentriert. Ein µl des gepoolten Überstands wurde auf jeden „Anker“ (386/Target) mit 400 µm Durchmesser appliziert. Nachdem die Tropfen auf die Größe des „Ankers“ geschrumpft waren, wurden 0,5 µl Matrixlösung zugegeben.

2.2.9.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI basiert auf der Kokristallisation der Peptide mit UV-Strahlung absorbierenden Molekülen in einer Matrix. Dabei übertragen die sauren, die UV-Strahlung absorbierenden Moleküle Protonen auf die Peptide und laden sie in den meisten Fällen positiv auf. Die Matrix wird im Hochvakuum des Massenspektrometers mit einem UV-Laser bestrahlt, der explosionsartig die Matrix-Moleküle freisetzt. Es entsteht eine Gaswolke die die positiv geladenen Peptidionen enthält. Die Peptidionen werden dann in einem elektrischen Feld beschleunigt und gelangen in den *Time of flight* (TOF)-Analysator. Das elektrische Feld beschleunigt alle Ionen mit der gleichen Energie. Die erreichte Geschwindigkeit eines Ions hängt dann von dem Quotienten Masse durch Ladung (m/z) des Ions ab. Daher werden zwei Proteine mit derselben Ladung aber unterschiedlicher Masse unterschiedlich beschleunigt: das Protein mit der kleineren Masse erreicht zudem eine höhere Geschwindigkeit. Ein zweiwertig geladenes Protein erreicht eine höhere Geschwindigkeit als das gleiche Protein mit nur einer Ladung.

Der TOF-Analysator ist ein feldfreies Flugrohr, in dem die Ionen nicht mehr weiter beschleunigt werden, sie fliegen hier mit der zuvor erreichten Geschwindigkeit. Im TOF-Analysator wird die Flugzeit der Ionen vom Eintritt in das Flugrohr bis zum Auftreffen auf einen Detektor am Ende des Flugrohrs gemessen.

Zur Analyse und Identifikation der tryptischen Peptide wurde MALDI-TOF Massenspektrometrie mit einem Massenspektrometer mit einer SCOUT 384 Ionenquelle verwendet. Die Beschleunigungsspannung betrug 25 kV und die Reflektorspannung wurde anfänglich auf 21.6 kV festgesetzt. Die interne Kalibrierung basierte auf tryptischen Peptiden (842,510 Da; 2211,105 Da). Die Reflektionsspannung wurde in 14 Schritten von 21 kV auf 0,65 kV reduziert. Das Zusammenfügen der 14 Einzelspektren basierte auf einer Kalibrierung mit Peptiden aus dem Adrenocorticotrophen Hormon (ACTH). Die Spektren wurden manuell gelabelt. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem Sun Ultra Computer unter Zuhilfenahme der XACQ Software, Version 4.0. Die Nachbearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der XMASS Software.

2.2.9.3 ESI-Massenspektrometrie

Alternativ zur MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde eine ESI-Massenspektrometrie durchgeführt. Hierfür wurde ein Gerät mit einer Elektrospray-Ionenquelle verwendet. Dem Gerät war eine *Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC)-Anlage vorgeschaltet.

Bei der ESI werden Proteinionen nicht in eine Matrix eingebaut sondern aus einer feinen Kapillare versprüht. Gegenüber der Kapillare befindet sich eine Gegenelektrode. Zwischen Kapillare und Gegenelektrode besteht eine sehr hohe Potentialdifferenz so dass je nach Polarität positiv oder negativ geladene Ionen an die Oberfläche der Lösungströpfchen treten. Die Tröpfchen werden somit zum Gegenpol gezogen. Auf dem Weg dorthin verdampft Lösungsmittel und die Tröpfchen werden kleiner. Gleichzeitig nimmt aber die Ladungsdichte zu bis die Tröpfchen schließlich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zerplatzen (Coloumb-Explosion). Es entsteht ein Ionengas.

Dieses Ionengas gelangt in einen Quadrupol-Analysator. Dieser Analysator besteht aus vier parallelen Metallstäben die im gleichen Abstand zueinander angeordnet sind. An die diagonalen Partner werden je ein Wechsel- und ein Gleichstrom angelegt. Der Analysator hat also vier Pole. Zu jedem Ion existiert ein Verhältnis von Gleich- (U) und Wechselspannung (V), das dem Ion die Passage des Analysators ermöglicht. Allerdings können nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis bei einem bestimmten U/V-Verhältnis entlang der vier Pole fliegen, da der Quadrupol als Massenfilter wirkt. Im Zuge des Messvorgangs wird dann V variiert.

Es wurden immer 10 µl einer verdauten Proteinprobe (ca. 75 fmol pro Peptid) in die HPLC-Anlage injiziert. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über einen Gradienten von 2-50% Azetonitril (mit 0,1% Ameisensäure) bei einer Flussrate von 0,2 µ/Minute. In der anschließenden Massenspektrometrie wurde eine Spannung von 1000 bis 1200 Volt angelegt um die ESI zu initiieren.

2.2.9.4 Datenbanksuche auf Grundlage der Peptidmassenfingeraabdruck-Spektren

Um die in den Gelstücken enthaltenen Proteine schließlich zu identifizieren wurden die mit Hilfe der Massenspektrometrie gemessenen Spektren, die so genannten Peptidmassenfingeraabdruckspektren (MALDI-MS) oder Fragmentionenspektren (ESI-MS/MS), mit einer Datenbank verglichen.

Die gemessenen Spektren wurden unter Zuhilfenahme der nichtredundanten NCBI Proteindatenbank mit Hilfe von Biotoools (Version 2.2, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) analysiert. Zur automatischen Interpretation der Fragmentionenspektren (MS/MS) wurde der SEQUEST-Algorithmus (Version 2) während des Screenens der NCBI-Datenbank verwendet.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden in Form von Tabellen aufgelistet, jedes identifizierte Protein wurde der Spotidentifikationsnummer (Spot ID) zugeordnet. Des Weiteren wurde für jedes identifizierte Protein der passende Gencode aufgelistet, da dieser im Gegensatz zu den Proteinennamen (es existieren oft verschiedene Namen für das gleiche Protein) eindeutig ist. Alle identifizierten Proteine sowie Zusatzinformationen sind im Anhang (Tabelle 15 und 16) aufgeführt. Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse wurde ausserdem der frei zugängliche Online-Dienst *WebGestalt* [76] genutzt.

2.2.10 Immunoblotting

Die von *Burnette et al.* als „Western-Blotting“ bezeichnete Methode wurde ursprünglich von Towbin (1979) entwickelt [77]. Das Western-Blotting, auch Immunoblotting genannt, wurde inzwischen vielfältig ergänzt und verändert. Prinzipiell werden bei diesem Verfahren die mittels einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Da die Proteine hierdurch konzentriert auf der Oberfläche der dünnen Membran vorliegen ist eine selektive Detektion von bestimmten Proteinen über spezifisch an sie bindende Antikörper möglich. Je nachdem, ob der Transfer der Proteine auf die Membran in einem mit Puffer gefüllten Behälter stattfindet oder innerhalb eines zwischen zwei Elektroden gelagerten und mit Puffer befeuchteten Papierstapels stattfindet, spricht man von einem Wet- oder Semi-Dry-Verfahren.

Im Rahmen dieser Studie wurde der Transfer der Proteine auf die Membran nach dem Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Als unterste Schicht wurden dabei drei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Stücke Chromatographiepapier in Kathodenpuffer getränkt und mit den Fingern leicht gedrückt, um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Sie wurden als Stapel auf die Kathodenplatte der Blotting-Apparatur blasenfrei aufgelegt. Darauf wurde ein, erst in Methanol, dann in Membranpuffer, geschwenktes, gelgroßes Stück einer PDVF-Membran aufgelegt, auf das dann das SDS-Gel gelegt wurde. Eine Ecke der PVDF-Membran wurde mit Kugelschreiber markiert, um die Lage des Gels auf der Membran anzuzeigen. Auf den Stapel wurden dann drei in Anodenpuffer getränkte Stücke Chromatographiepapier aufgelegt. Die Blotting-Apparatur wurde daraufhin geschlossen. Der elektrophoretische Transfer der im SDS-Gel enthaltenen Proteine auf die PVDF- Membran erfolgte zwei bis zweieinhalb Stunden lang bei 35,5 mA pro Blot. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol diente dazu, das Benetzen der Membran zu erleichtern und die Bindung der Proteine an das SDS zu lockern, was wiederum ihre Bindung an die PVDF-Membran verbessert. Alle für das Western-Blotting benötigten Puffer wurden immer erst vor dem Blotten mit Methanol versetzt. Die PVDF- Membran wurde nach dem Blotten für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer auf einem Schüttler inkubiert, um überschüssige Proteinbindestellen der Membran zu saturieren und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern.

Um bestimmte, an die PVDF-Membran gebundene Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Antikörpern inkubiert. Es wurde die Methode der indirekten Markierung über mit Meerrettichperoxidase versehene Sekundär-Antikörper gewählt. Sie binden universell an konstante Bereiche der primären Maus- oder Kaninchen- Antikörper und markieren diese somit indirekt. Ein weiterer Vorteil der indirekten Markierung ist,

dass mehr als ein Sekundär-Antikörper an einen Primär-Antikörper bindet wodurch die Markierung verstärkt wird. Die Visualisierungsreagenzien waren in dem „ECL-Western-Blotting analysis system“ enthalten. Es basierte auf einer durch Wasserstoffperoxid katalysierten Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen. Wenn das, durch die Oxidation angeregte, Luminol wieder in den Grundzustand zurückkehrte, geschieht das mit einer als Lumineszenz bezeichneten Lichtemission. Diese Emission ist nach 5 bis 10 Minuten maximal und flaut in den nächsten 60 Minuten langsam ab. Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 428 nm und wurde mit einem blaulichtempfindlichen Autoradiographiefilm detektiert. Bei schwächeren Signalen wurde das Femto-ECL-Kit verwendet.

Die blockierte PVDF-Membran wurde zunächst über Nacht bei 4°C mit den in dem Blockierungspuffer suspendierten Primär-Antikörpern auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde sie in 15 Minuten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit 5 ml des Sekundär-Antikörpers, der 1:5000 in Blockierungspuffer suspendiert war, wieder eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran in derselben Weise wie zuvor gewaschen und mit 1 ml eines kurz vorher vorbereiteten 1:1 Gemisches der Reagenzien 1 und 2 (ECL-Kit), das auf ihrer Oberfläche gleichmäßig verteilt wurde, für 1 Minute inkubiert. Dann wurde die Membran von beiden Seiten in eine Klarsichtfolie faltenfrei verpackt und sofort in den Dunkelraum getragen, wo sie für eine Stunde auf einen unbelichteten Autoradiographiefilm gelegt wurde. Der Film wurde daraufhin entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des APP23-Mausmodells für die Alzheimer-Krankheit

Die Gehirnproteine der APP23-Mäuse wurden mit Hilfe der 2-DE in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen (DIGE-Methode, *Minimal Labelling*) untersucht. Dabei wurden zunächst die Spotmuster mittels der Software *Delta2D* quantifiziert und verglichen. Signifikant unterschiedliche Proteinspots wurden dann aus den 2-D-Gelen ausgestochen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Um Unterschiede im Gehirnproteom der APP23-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen zu suchen, wurden die Spotmuster beider Gruppen verglichen. Es wurden die Gehirnregionen Cortex und Hippocampus von Mäusen der Altersstadien 1, 2, 7 und 15 Monate sowie der Cortex sechzehn Tage alter Mausembryonen (ET16) analysiert (n=6 für alle Stadien/Gehirnregionen).

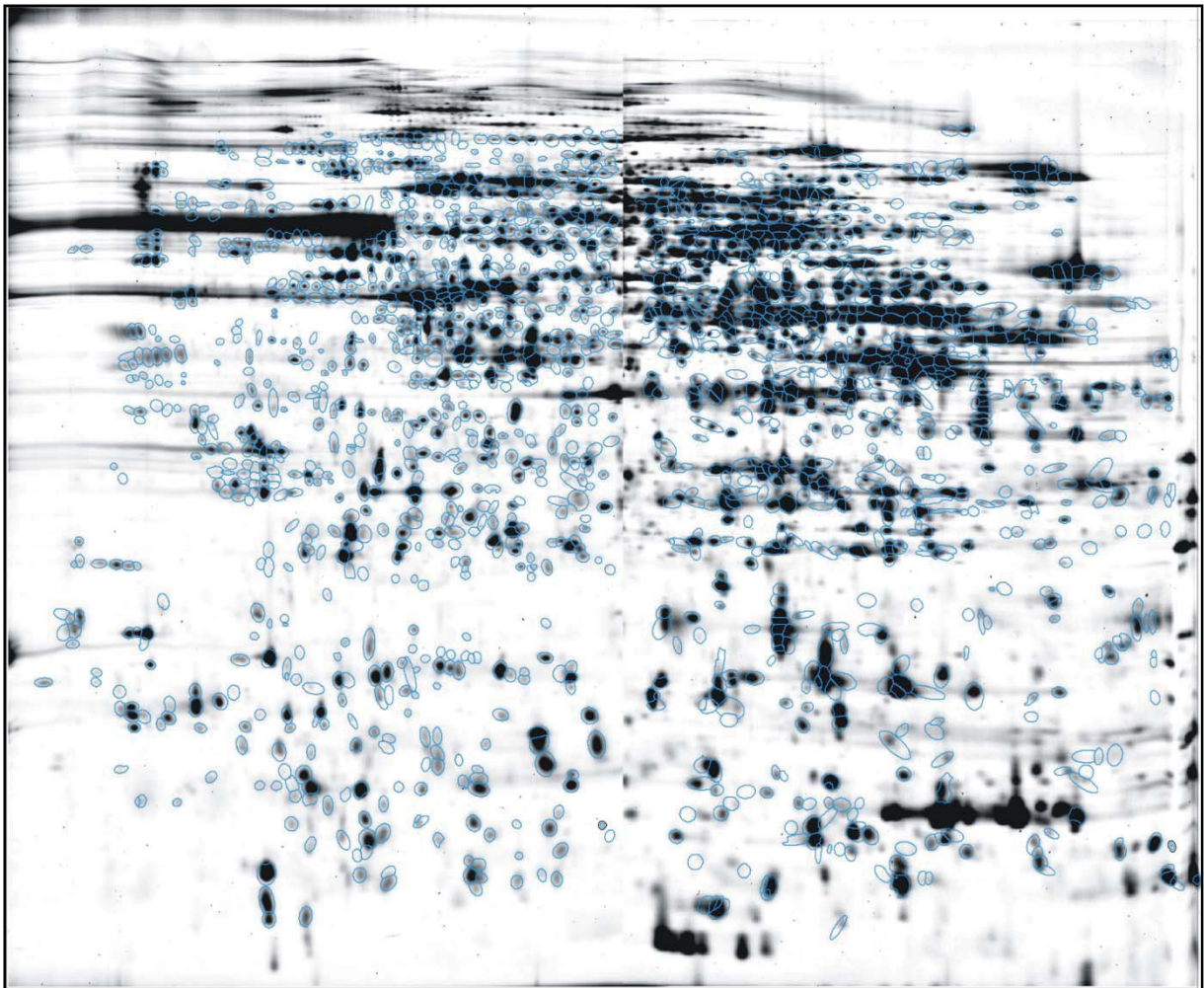


Abbildung 12: Standardspotmuster. Eine Gruppe von 1769 Proteinspots (blau umrandet) wurde in allen adulten Altersstadien der APP23-Mäuse untersucht.

Alle zu vergleichenden Gele wurden mit demselben Farbstoff (Cy3) markiert. Weiterhin wurde eine Gruppe von 1769 Spots festgelegt, die auf jedem Proteinmuster des gesamten Projektes erfasst wurde (Abbildung 12). Jeder Spot hatte also auf den Proteinmustern jedes Altersstadiums oder jeder Gehirnregion dieselbe Identifikationsnummer, was auch den Vergleich der Expression nicht identifizierter Proteinspots zwischen allen Gruppen ermöglichte. Nur die Proteinmuster der ET16-Proben wurden gesondert ausgewertet da sich die embryonalen Proteinmuster stark von den adulten Mustern unterschieden.

3.1.1 Vergleich der Proteinmuster von APP23- und Wildtypmäusen

Zunächst wurden die Proteinmuster der transgenen Tiere mit den Wildtypmustern verglichen. Dabei wurde in allen untersuchten Alterstadien sowie in den beiden Gehirnregionen Hippocampus und Cortex eine große Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinspots ($p \leq 0,05$; Student t-Test, gepaart) gefunden (Abbildung 13).

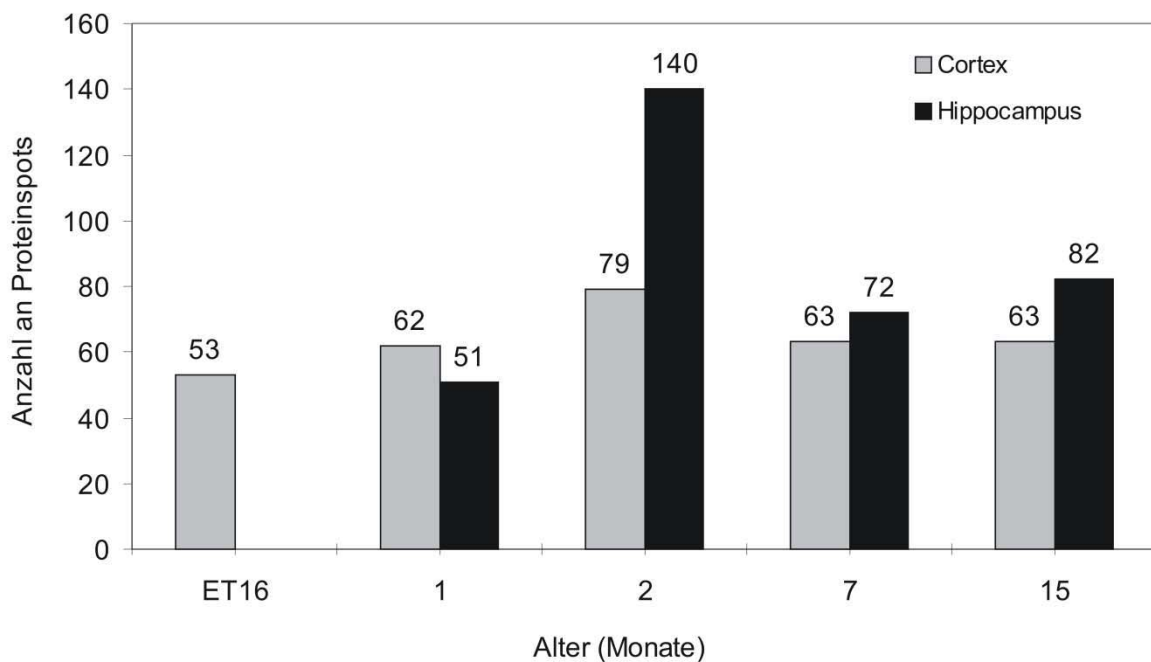


Abbildung 13: Anzahl der in den verschiedenen Altersstadien (x-Achse) beziehungsweise in den beiden Gehirnregionen Cortex (hellgraue Balken) oder Hippocampus (schwarze Balken) der APP23-Mäuse signifikant veränderten Proteinspots (y-Achse). Im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse ist ein deutlicher Peak in der Anzahl der Veränderungen erkennbar.

Im Cortex unterschieden sich in den Altersstadien ET16, 1, 7 und 15 Monate rund 3,5% der untersuchten Proteinspots signifikant in ihrer Abundanz zwischen APP23- und Wildtypmäusen. Bei zwei Monate alten Tieren unterschieden sich 4,5% der untersuchten Proteinspots. Die genaue Anzahl an signifikant veränderten Spots pro Altersstadium ist aus Abbildung 13 ersichtlich.

Im Hippocampus unterschieden sich rund 4,5% der Spots bei sieben und fünfzehn Monate alten Tieren. Bei einen Monat alten Tieren unterschieden sich rund 3% der Spots. Bei zwei Monate alten Tieren wurde jedoch interessanterweise eine im Vergleich zu allen anderen Stadien deutlich höhere Anzahl von rund 8% an signifikant unterschiedlichen Spots detektiert (siehe Abbildung 13).

Ähnliche Resultate ergab eine Analyse der Gesamtproteinkonzentration varianter Spots (Abbildung 14). Hierfür wurden die Volumina der in den Mustern der APP23-Mäuse signifikant veränderten Proteinspots addiert. Das Volumen eines Spots entspricht der Konzentration der zugrunde liegenden Proteine in Relation zu allen auf dem Proteinmuster sichtbaren Spots. Das Gesamtvolumen aller veränderten Spots kann also der relativ veränderten Proteinmenge gleichgesetzt werden.

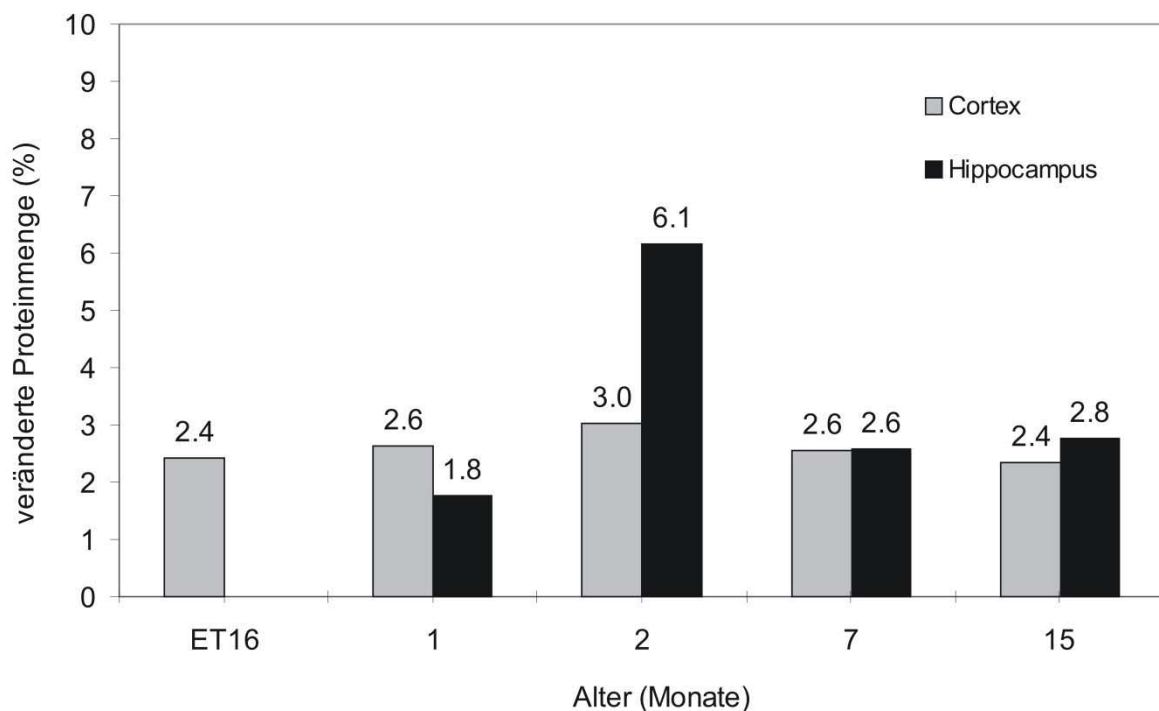


Abbildung 14: Prozentual zur Gesamtmenge aller untersuchten Spots veränderte Proteinmenge (y-Achse) in den verschiedenen Altersstadien (x-Achse) beziehungsweise in den beiden Gehirnregionen Cortex (hellgraue Balken) oder Hippocampus (schwarze Balken) der APP23-Mäuse. In allen Altersstadien ist ähnlich viel verändert, im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse ist jedoch ein deutlicher Peak in der relativ veränderten Proteinmenge erkennbar.

Im Cortex waren in den Altersstadien ET16, 1, 7 und 15 Monate rund 2,5% der insgesamt erfassten Proteinmenge verändert. Im Alter von 2 Monaten bestand ein Unterschied von 3%. Im Hippocampus waren in den Altersstadien 7 und 15 Monate rund 2,7%, im Alter von einem Monat 1,8% und im Alter von zwei Monaten 6,1% der untersuchten Gesamtproteinkonzentration verändert.

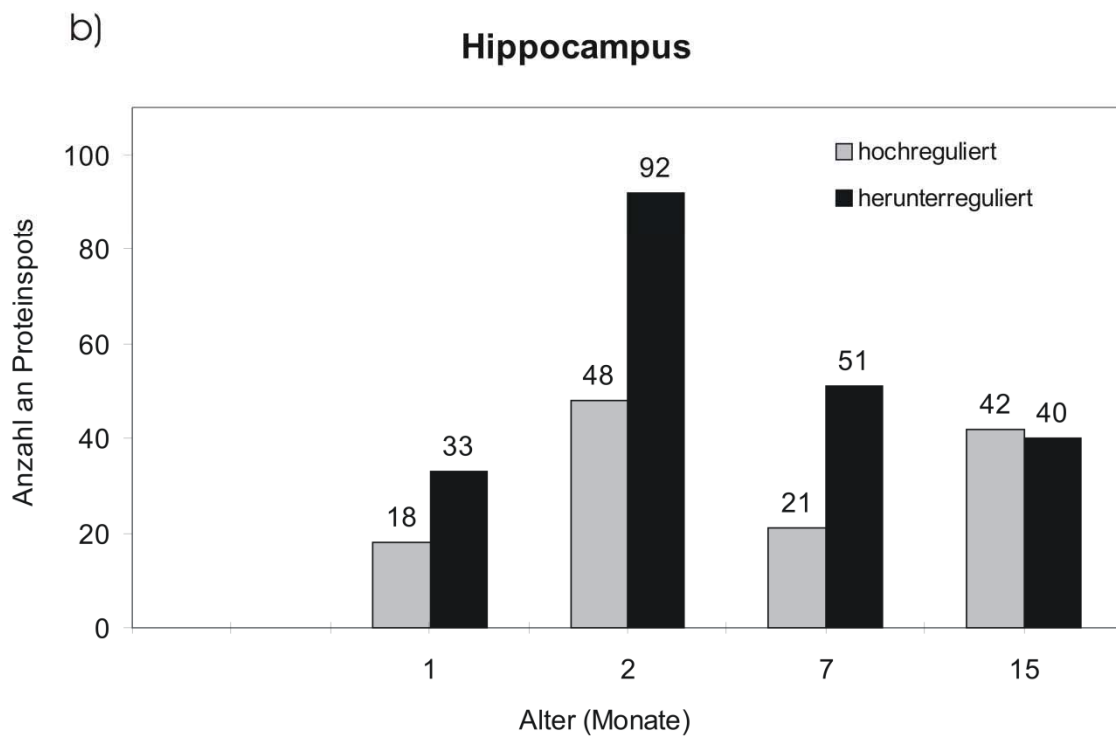
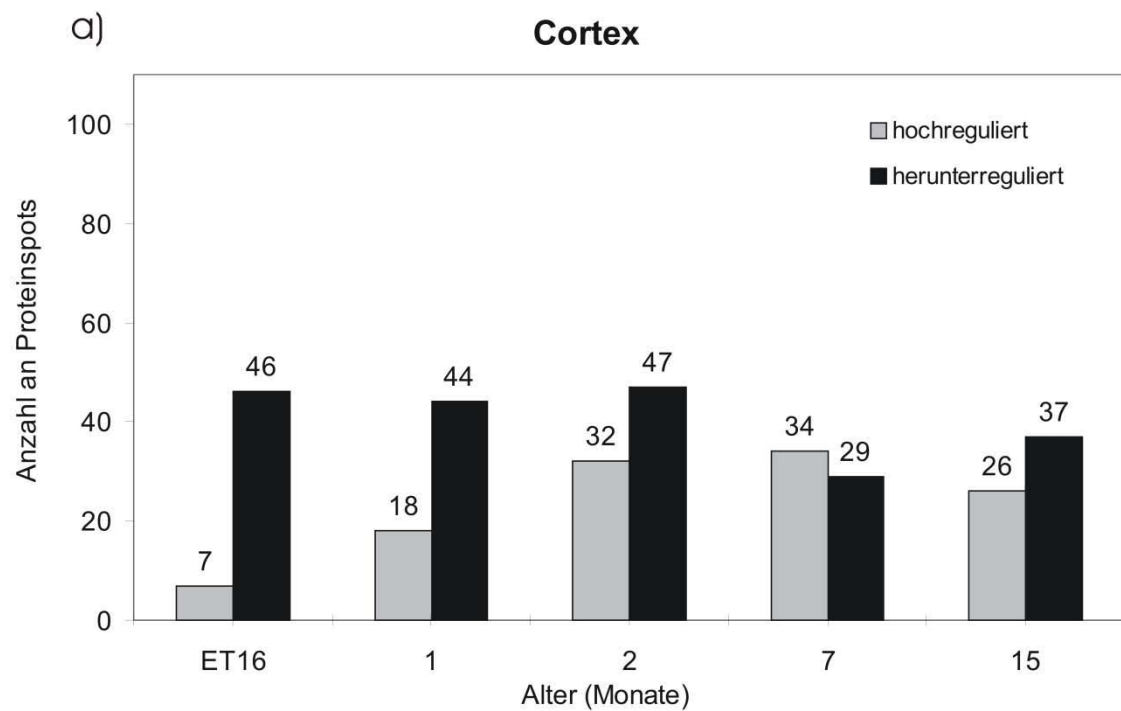


Abbildung 15: Richtung der signifikanten Spotunterschiede. Im Cortex (a) der APP23-Mäuse sind in den jüngeren Altersstadien ET16 bis 2 Monate deutlich mehr Proteine herunter- (schwarze Balken) als hochreguliert (hellgraue Balken). In den übrigen Altersstadien gleichen sich Hoch- und Herunterregulation aneinander an. Im Hippocampus (b) der APP23-Mäuse überwiegt die Anzahl der herunterregulierten Proteine in den Altersstadien 1, 2 und 7 Monate deutlich.

Die Untersuchung der Richtung der Expressionsveränderung ergab, dass im Cortex der jüngeren APP23-Mäuse (ET16 bis 2 Monate) deutlich mehr Spots herunter- als hochreguliert waren. In ET16 betrug die Differenz 39 Spots, in ein und zwei Monate alten Mäusen betrug sie 26 und 15 Spots. In sieben und fünfzehn Monate alten Mäusen war die Anzahl hoch- und herunterregulierter Spots ähnlicher. Die Differenz betrug bei sieben Monate alten Mäusen 5 Spots in Richtung Hochregulation und bei fünfzehn Monate alten Mäusen 11 Spots in Richtung Herunterregulation (genaue Anzahl der veränderten Spots sind aus Abbildung 15a ersichtlich).

Auch im Hippocampus der einen bis sieben Monate alten APP23-Mäuse war die Mehrzahl der Spots herunterreguliert. Die Differenzen betrugen 15 (ein Monat), 44 (zwei Monate) und 30 Spots (sieben Monate). Bei fünfzehn Monate alten Mäusen waren Hoch- und Herunterregulation fast ausgeglichen, die Differenz betrug 2 Spots in Richtung Hochregulation (genaue Zahlen in Abbildung 15b).

Die Analyse der veränderten Proteinkonzentration ergab ähnliche Werte.

Um einen systematischen Fehler auszuschließen, wurden die aufsummierten Standardabweichungen aller Spots der verschiedenen Gruppen („Transgen“ und „Wildtyp“ in den verschiedenen Altersstadien) verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden (Student t-Test).

Zusammengenommen ergab der Vergleich der Proteinmuster, dass sich in allen Altersstadien 4% bis 5% der untersuchten Proteine quantitativ zwischen APP23-Mäusen und Wildtypmäusen unterschieden. Nur im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse, einem sehr frühen Altersstadium, wurde eine deutlich höhere Anzahl varianter Proteinspots detektiert.

3.1.2 Analyse entwicklungsbedingter Proteomveränderungen

In einem nächsten Schritt wurden entwicklungsbedingte Veränderungen im Proteom der APP23-Mäuse sowie der Wildtypmäuse untersucht. Hierfür wurden die Proteinmuster *zwischen* den Altersstadien verglichen. Es wurden jeweils die Altersstadien ein Monat gegen zwei Monate sowie zwei Monate gegen sieben Monate und sieben Monate gegen fünfzehn Monate verglichen. Die Vergleiche wurden für Cortex und Hippocampus der APP23- sowie der Wildtypmäuse durchgeführt (Abbildung 16).

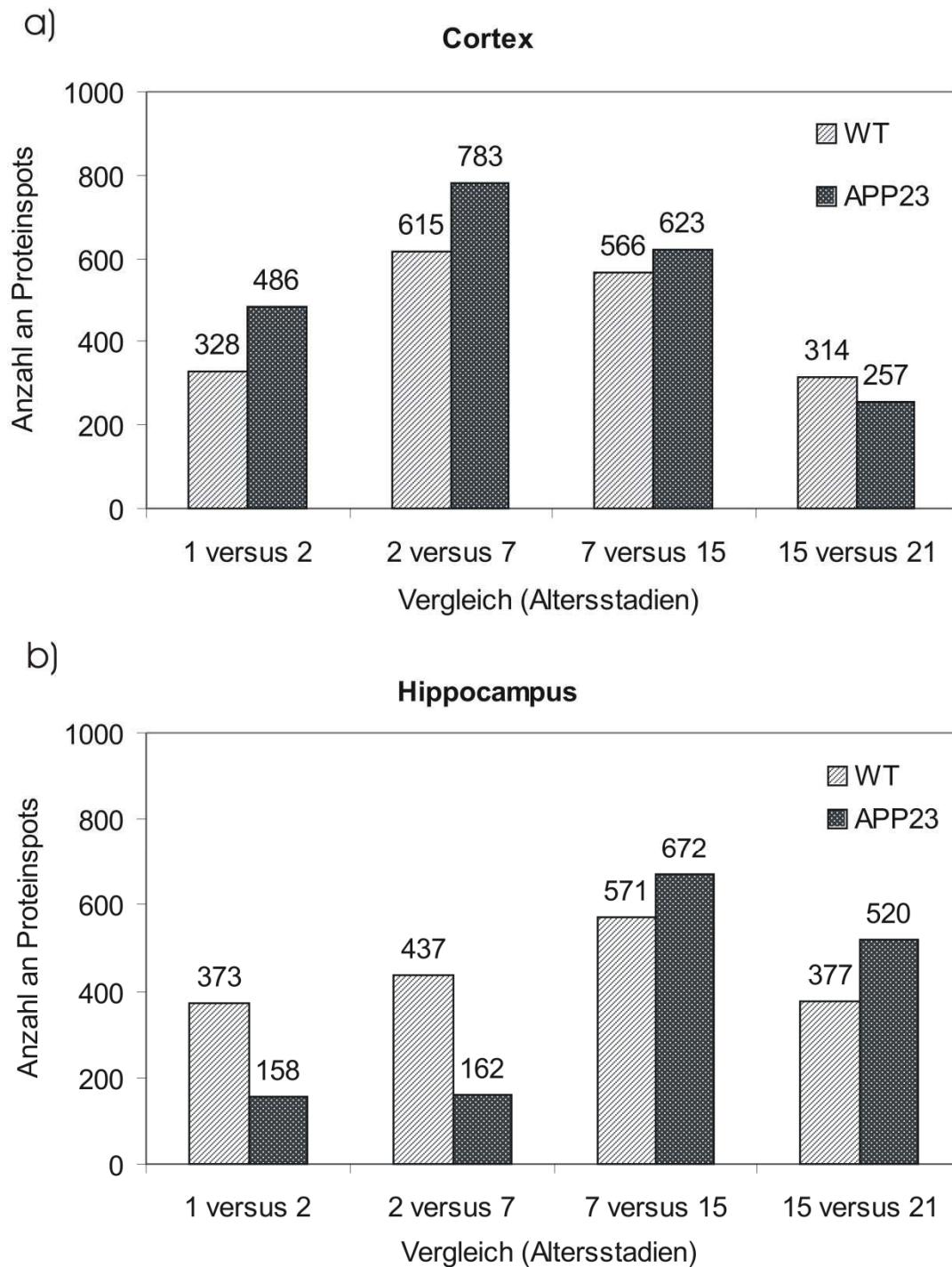


Abbildung 16: Entwicklungsbedingte Proteomveränderungen in den Wildtypmäusen (hellgraue Balken) und den APP23-Mäusen (dunkelgraue Balken). Im Cortex (a) der APP23-Mäuse war im Vergleich zu Wildtypmäusen immer eine leicht höhere Anzahl an Proteinen verändert. Im Hippocampus (b) der APP23-Mäuse war bei einem Vergleich der Altersstadien 1 und 2 Monate sowie 2 und 7 Monate eine deutlich geringere Anzahl an Proteinen verändert als in Wildtypmäusen. Vergleicht man die Altersstadien 7 und 15 Monate, so waren, wie im Cortex, in den APP23-Mäusen mehr Proteine verändert.

Im Cortex von Wildtypmäusen unterschieden sich 23% aller untersuchten Spots zwischen den Altersstadien 1 und 2 Monate signifikant ($p \leq 0,05$; Student t-Test) hinsichtlich ihrer Abundanz. Zwischen den Stadien 2 und 7 sowie 7 und 15 Monate unterschieden sich 63% beziehungsweise 39% der Spots signifikant. Bei transgenen Mäusen waren in jedem Vergleich etwas mehr Proteinspots verändert. Zwischen 1 und 2 Monaten waren es 34%, zwischen 2 und 7 Monaten 74% und zwischen 7 und 15 Monaten unterschieden sich 41% der Spots (Anzahl der veränderten Spots in Abbildung 16a).

Im Hippocampus von Wildtypmäusen waren 48%, 57% und 34% der Spots zwischen den Altersstadien 1 und 2, 2 und 7 beziehungsweise 7 und 15 Monaten verändert. Im Hippocampus der APP23-Mäuse wurde in den ersten beiden Vergleichen eine deutlich geringere Anzahl von entwicklungsbedingt veränderten Spots detektiert. Zwischen den Altersstadien 1 und 2 Monate unterschieden sich 13% der Spots und zwischen 2 und 7 Monaten waren es 14% der Spots. Zwischen 7 und 15 Monaten waren 41% der Spots verändert (Anzahl der veränderten Spots in Abbildung 16b).

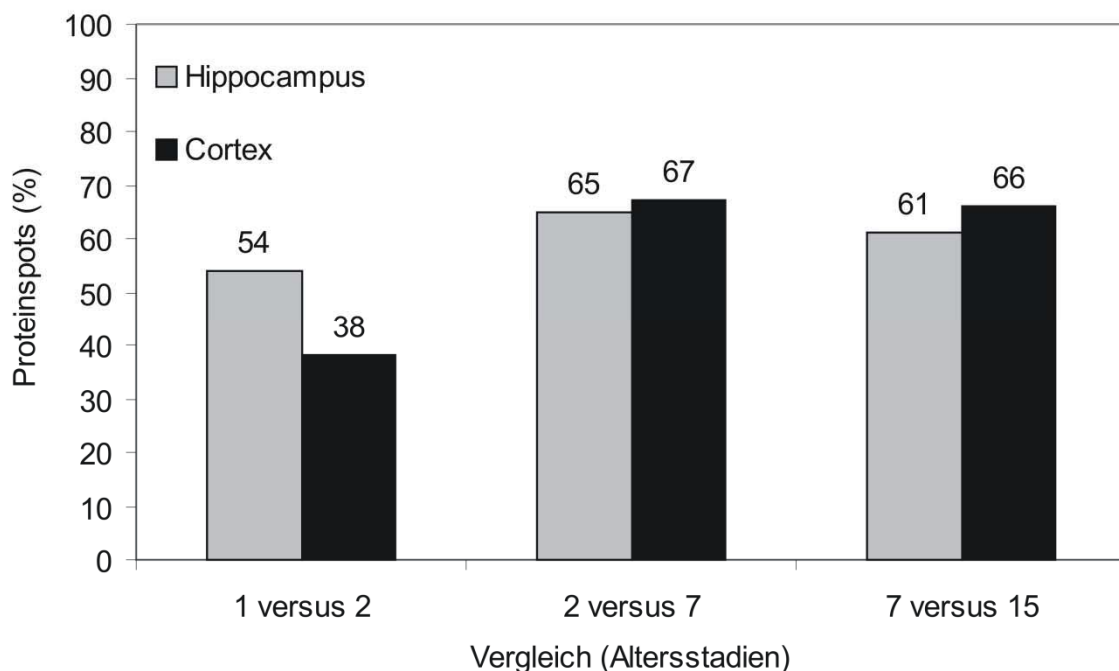


Abbildung 17: Prozentuale Überlappung der in den APP23-Mäusen entwicklungsbedingt veränderten Proteinspots mit den in den Wildtypmäusen entwicklungsbedingt veränderten Proteinspots. Im Hippocampus (hellgraue Balken) überlappten in den verglichenen Altersstadien 54% bis 65% der veränderten Spots. Im Cortex (schwarze Balken) waren es 38% bis 67%.

Ein Vergleich der veränderten Proteinspots ergab, dass 38% bis 67% der in den APP23-Mäusen veränderten Proteine auch in den Wildtypmäusen im Laufe der Entwicklung verändert waren (Abbildung 17). Die entwicklungsbedingten Proteomveränderungen überlappen sich also zwischen APP23- und Wildtypmäusen grösstenteils.

Zusammengenommen ergab die Untersuchung entwicklungsbedingter Veränderungen, dass in der Altersphase von einem Monat bis zu sieben Monaten viele Veränderungen im hippocampalen Proteom der Wildtypmäuse bei den APP23-Mäusen ausgeblieben waren.

3.1.3 Identifizierung und Einteilung der varianten Proteine

Diejenigen Proteinspots, die sich hinsichtlich ihrer Abundanz signifikant zwischen APP23-Mäusen und Wildtypmäusen unterschieden, wurden aus den angefärbten 2-D-Gelen (MS-Silberfärbung) ausgestochen und mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Hierbei wurde in allen Fällen, in denen der gleiche Proteinspot in verschiedenen Gehirnregionen oder Altersstadien verändert war, der Spot in allen Stadien separat analysiert um sicher zu gehen, dass ihm auch in jedem Stadium oder jeder Gehirnregion das gleiche Protein zugrunde liegt. Dies konnte in allen Fällen bestätigt werden. Aus diesem Grunde wurde auch bei allen nicht identifizierten Proteinspots angenommen, dass ihnen in jedem Proteinmuster des gesamten Projektes (außer bei ET16) immer das gleiche Protein zugrunde lag.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten 65% aller veränderten Proteinspots eindeutig identifiziert werden. Ein Protein kann auf einem 2-D-Gel aufgrund des Vorhandenseins von Isoformen in mehreren Spots vorliegen. Allen identifizierten Proteinspots lagen 293 nicht-redundante Proteine zugrunde. Eine Liste aller identifizierten Proteine, deren Zuordnung zu den verschiedenen Stadien sowie Zusatzinformationen der Massenspektrometrie werden im Anhang aufgeführt.

3.1.3.1 Funktionelle Kategorisierung

Um einen Überblick über die zellulären Funktionen der veränderten Proteine zu erhalten, wurden alle 293 identifizierten Proteine gemäß ihrer GO-Annotationen (*Gene Ontology*, GO) beziehungsweise anhand einer Literaturrecherche in acht funktionelle Hauptgruppen unterteilt. Die funktionellen Kategorien waren an die Pathway-Kategorien der KEGG-Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) angelehnt. Für die Einteilung der Proteine wurde weiterhin der Online-Dienst *Webgestalt* [76] genutzt.

Mit Hilfe der funktionellen Einteilung konnten rund 90% aller Proteine in die acht funktionellen Gruppen „Metabolismus“ (Untergruppen „Kohlenhydrat- (KH), Energie-, Aminosäuren- (AS) und Lipidmetabolismus“), „Zytoskelett“, „Signaltransduktion“, „Faltung, Sortierung“, „Transkription, Translation und Nukleotidmetabolismus“, „Abbau“, „Neuron“ sowie „Zellwachstum und –tod“ unterteilt werden (Tabelle 8). Zu den übrigen Proteinen lag keine für eine Einteilung ausreichende Information vor.

Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der in verschiedenen Altersstadien (ET16, 1, 2, 7 oder 15 Monate) und Gehirnregionen Cortex (C) oder Hippocampus (H) veränderten Proteine über acht funktionelle Kategorien.

Funktionelle Kategorie	Altersstadium, Gehirnregion								
	1H	2H	7H	15H	ET16	1C	2C	7C	15C
1. Metabolismus	34	25	33	35	16	34	23	30	40
1.1 KH-Metabolismus	13	9	15	19	10	16	7	10	13
1.2 Energie-Metabolismus	10	4	5	2	3	9	3	7	6
1.3 AS-Metabolismus	5	2	7	6	3	5	5	9	4
1.4 Lipid-Metabolismus	7	9	5	8	0	5	8	5	17
2. Zytoskelett	10	10	14	19	0	8	13	10	13
3. Signaltransduktion	7	9	13	15	13	6	8	13	2
4. Faltung, Sortierung	7	11	7	8	3	9	12	9	8
5. Transkription, Translation, Nucleotid- Metabolismus	3	8	10	2	39	14	13	9	4
6. Abbau	5	8	8	6	19	8	0	10	10
7. Neuron	7	6	4	2	0	8	10	1	8
8. Zellwachstum und -tod	2	2	3	4	0	6	2	2	6

Die Verteilung der Proteine über die acht funktionellen Kategorien war bei allen adulten Altersstadien ähnlich und ist in Tabelle 8 hierarchisch nach der Anzahl der Proteine (in %; bezogen auf die Gesamtzahl der in den jeweiligen Stadien veränderten Proteine) gegliedert. Bei ET16 wich die Verteilung dahingehend ab, dass hier die meisten veränderten Proteine der Gruppe „Transkription, Translation, Nucleotid Metabolismus“ und nicht der Gruppe „Metabolismus“, wie in allen anderen Stadien, angehörten. Weiterhin konnte keines der in ET16 veränderten Proteine in die Gruppen „Lipid-Metabolismus“, „Zytoskelett“, „Neuron“ und „Zellwachstum und –tod“ eingeordnet werden. Die bei ET16 abweichende Verteilung der Proteine über die funktionellen Gruppen entspricht jedoch größtenteils der Verteilung von Proteinen, die während der normalen Embryonalentwicklung im Gehirn von Mäusen verändert sind (siehe Tabelle 13). Nur die Gruppe „Abbau“ entspricht nicht dieser Verteilung. Sie ist die an ET16 am zweitstärksten vertretene Gruppe. Während der Embryonalentwicklung war die Gruppe jedoch auf Platz 6 vertreten. Mitglieder der Gruppe „Abbau“ waren hauptsächlich Untereinheiten des 26S-Proteasom-Komplexes. Sie sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Untereinheiten des 26S-Proteasom-Komplexes die in den untersuchten Stadien (ET16, 1, 2, 7 oder 15 Monate) und den Gehirnregionen Cortex (C) oder Hippocampus (H) der APP23-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant verändert waren.

Proteinname	Genname	Altersstadium, Gehirnregion									
		ET16	1H	1C	2H	2C	7H	7C	15H	15C	
Proteasome subunit alpha type 3	Psma3		▼				▼	▼			
Proteasome subunit alpha type 5	Psma5	▼	▼				▼				
Proteasome subunit beta type 1	Psmbl								▲		
Proteasome subunit beta type 5	Psmb5	▼									
Proteasome subunit beta type 6	Psmb6				▼				▲		
Proteasome 26S subunit, ATPase, 4	Psmc4	▼									
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	Psmc4			▼	▼		▼				
▲ hochreguliert											
▼ herunterreguliert											

Obwohl die funktionelle Verteilung der veränderten Proteine zwischen den adulten Altersgruppen ähnlich war, waren die meisten Proteine (126 Proteine) nur in einem Stadium oder in einer Gehirnregion verändert. Nur 80 Proteine waren in zwei, 46 in drei und 28 Proteine waren in vier Stadien und/oder Regionen verändert. Insgesamt 13 Proteine waren in mehr als fünf Stadien und/oder Regionen verändert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Proteine die in fünf oder mehr untersuchten Stadien (ET16, 1, 2, 7 und 15 Monate) und/oder den Gehirnregionen Cortex (C) und Hippocampus (H) der APP23-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen verändert waren.

		Altersstadium, Gehirnregion								
Proteinname	Genname	ET16	1C	1H	2C	2H	7C	7H	15C	15H
Apolipoprotein E precursor										
(Apo-E)	Apoe			▲	▲		▲	▲	▲	▲
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b			▼			■	■	▼	▼
ATP synthase D chain, mitochondrial	Atp5h	▲	▲		▲		▲	▲		
Diazepam binding inhibitor isoform 2	Dbi			▲		▼	▼		▲	▼
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2			▲	▲	▲		▲	▼	
Enolase 2, gamma neuronal	Eno2		▲	▼		▲	▲	■	▲	▲
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 1	Gnb1			▼	▼	▼	▼	▼		▼
L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhb		▼				▼	▼	▼	▼
Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1		▼		▼	▼	▼	▼		
Protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1	Pin1		▼			▲		▲	▲	▼
Transkriptional activator protein										
Pur-alpha	Pura		▲	▲			▲	▲	▲	▲
Septin-7	Sept7		▼	▼		▼	▲	▼		▲
Triosephosphate isomerase	Tpi1		▲	▲		■	▼		▼	▲

▲ hochreguliert

▼ herunterreguliert

■ hoch- und herunterreguliert

Da APP in Prozesse der neuronalen Plastizität involviert ist, wurden in einem nächsten Schritt aus allen in den APP23-Mäusen veränderten Proteinen diejenigen herausgesucht, die mit neuronalen Plastizitätsprozessen in Verbindung gebracht werden können (Tabelle 11). Diese Proteine sind strukturelle Bestandteile von Synapsen oder sie sind direkt an der Synaptogenese oder Neurogenese beteiligt. Aufgrund ihrer spezifischen Funktion im Gehirn wurden die Proteine als neuronenspezifische Proteine bezeichnet.

Tabelle 11: Neuronenspezifische Proteine die in den Gehirnregionen Cortex (C) und/oder Hippocampus (H) 1, 2, 7 oder 15 Monate alter APP-23 Mäusen verändert waren.

Proteinname	Genname	Altersstadium, Gehirnregion							
		1H	2H	7H	15H	1C	2C	7C	15C
Brain abundant, membrane attached signal protein 1	Baspl						▼		▼
Complexin-1	Cplx1		▼				▼		
Complexin-2	Cplx2						▲	▲	
Diazepam binding inhibitor isoform 2	Dbi	▲	▼		▲			▼	▲
Postsynaptic density protein 95	Dlg4		▼			▼	▼		
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	▲	▲	▲			▲		▼
Neuromodulin	Gap43	▼	▼			▼	▼		
Beta-soluble NSF attachment protein	Napb			▼					
Gamma-soluble NSF attachment protein	Napg		▼		▼			▼	
Neuron derived neurotrophic factor	Nenf		▼						
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	Pacsin1		▼	▼		▼			
Septin-7	Sept7	▼	▼	▼	▼	▼		▲	
Synaptosomal-associated protein 25	Snap25			▼					
Syntaxin-binding protein 1	Stxbp1		▲		▼				▼
Synapsin I	Syn1						▲		
Synapsin-2	Syn2	▲	▼			▲			
Synapsin Ib	SynI		■				■		▼

▲ hochreguliert

▼ herunterreguliert

■ hoch- und herunterreguliert

Die Liste der neuronenspezifischen Proteine umfasst 17 Proteine. Von diesen Proteinen war kein Protein im Gehirn sechzehn Tage alter APP23-Mausembryonen verändert. Im Hippocampus und Cortex der adulten APP23-

Mäuse waren im Alter von einem, sieben oder fünfzehn Monaten jeweils vier oder fünf der gelisteten Proteine verändert. Bei zwei Monate alten Mäusen waren im Cortex acht und im Hippocampus zwölf Proteine verändert.

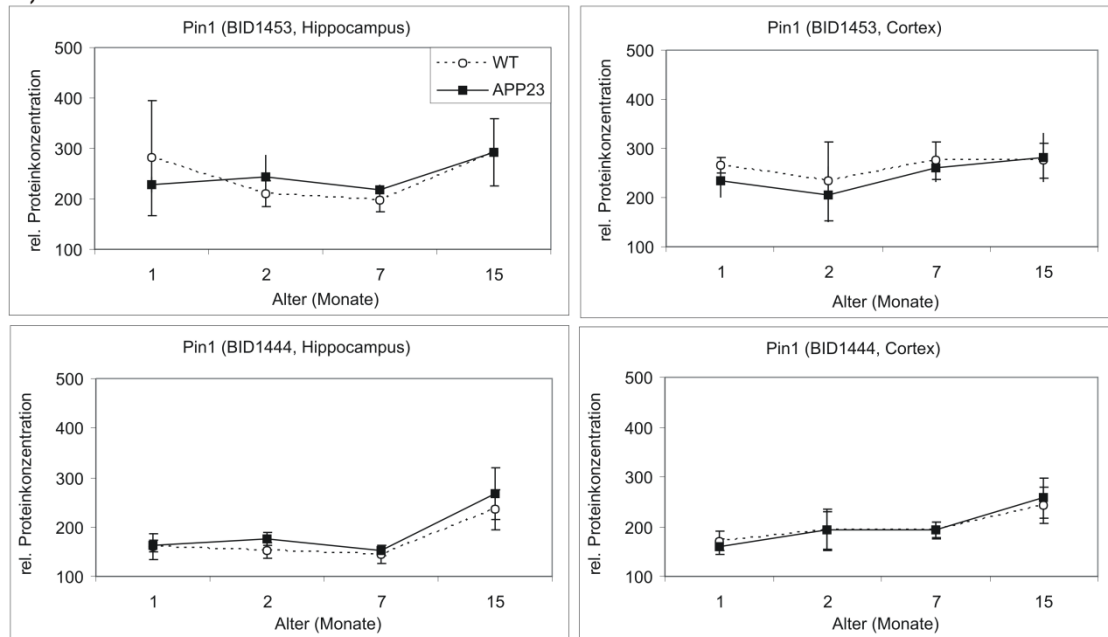
Die Mehrzahl der neuronenspezifischen Proteine war also im Hippocampus zwei Monate alter APP23-Mäuse verändert. Weiterhin waren hier die meisten neuronenspezifischen Proteine (9 Proteine) herunterreguliert. Nur zwei Proteine waren hochreguliert und ein Protein war je nach Isoform, hoch- oder herunterreguliert.

Zusammengenommen wurden in den APP23-Mäusen 293 Proteine identifiziert, die sich hinsichtlich ihrer Abundanz signifikant von den Wildtypen unterschieden. Diese Proteine konnten nach ihren zellulären Funktionen in acht Kategorien eingeteilt werden. Dabei war die funktionelle Verteilung dieser Proteine zwischen den verschiedenen Altersstadien und Gehirnregionen bis auf ET16 sehr ähnlich. Des Weiteren waren viele neuronenspezifische Proteine in zwei Monate alten APP23-Mäusen herunterreguliert.

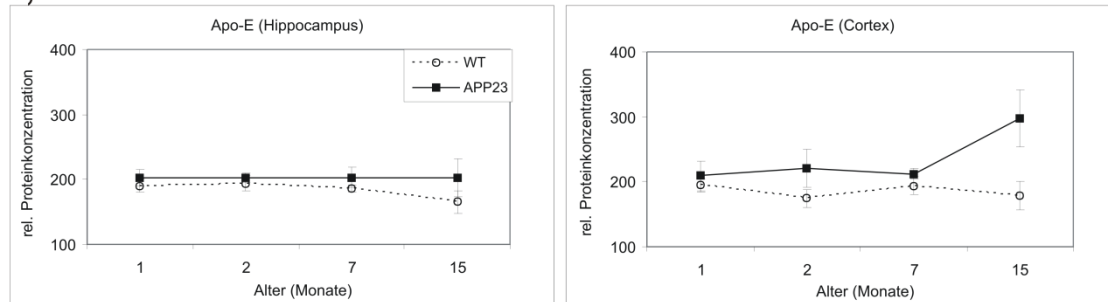
3.1.3.2 Analyse ausgewählter Proteine

Aus den in den Tabellen 10 und 11 aufgelisteten Proteinen wurden drei wichtige Proteine ausgesucht. Ihre Expression wurde näher untersucht. Die ersten beiden Proteine, *Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1* (Pin1) und *Apolipoprotein E* (Apo-E) wurden ausgesucht, da sie bekanntermaßen mit der AK in Verbindung stehen. Das dritte Protein, *Neuromodulin* (Gap43), wurde ausgewählt, da es einen wichtigen Marker für die neuronale Plastizität darstellt und damit von allen in Tabelle 11 aufgelisteten Proteinen die höchste Aussagekraft besitzt.

a)



b)



c)

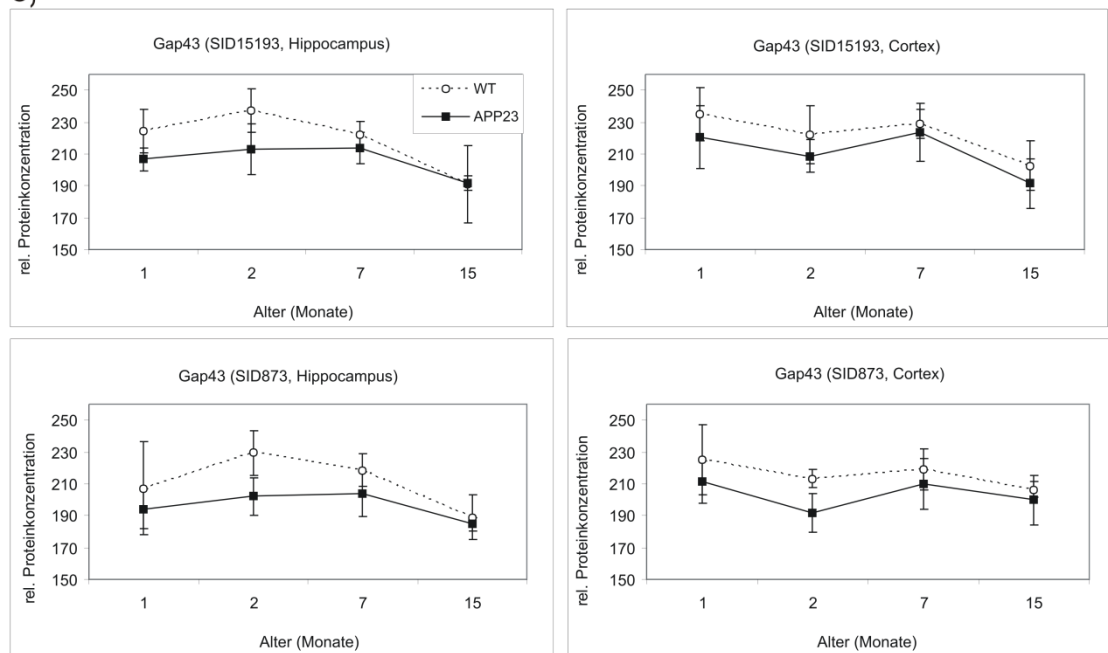


Abbildung 18: Expressionsverlauf der Spots von Pin1 (a, Isoformen BID1453 und BID1444), Apo-E (b) und Gap43 (c, Isoformen SID15193 und SID873) im Gehirn von Wildtypmäusen (unterbrochene Linie, leere Kreise) und von APP23-Mäusen (schwarze Linie, schwarz gefüllte Quader).

Signifikante Expressionsunterschiede (Student t-Test, $p \leq 0,05$) der Pin1-Spots (Abbildung 18a) wurden im Hippocampus von APP23-Mäusen von zwei zu sieben (nur Spot BID1453) und von sieben zu fünfzehn Monaten beobachtet. Bei Wildtypmäusen war die Pin1-Expression von sieben zu fünfzehn Monaten signifikant hochreguliert. Im Cortex war die Expression von Pin1 von sieben zu fünfzehn Monaten signifikant hochreguliert (nur Spot BID1453).

Die Expression von Apo-E (Abbildung 18b) war im Hippocampus der Wildtypmäuse von sieben zu fünfzehn Monaten signifikant herunterreguliert, bei APP23-Mäusen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersstadien erkennbar. Im Cortex war die Apo-E-Expression bei Wildtypmäusen von einem zu zwei Monaten erst signifikant herunterreguliert und dann von zwei zu sieben Monaten wieder hochreguliert. Bei APP23-Mäusen war die Apo-E-Expression von sieben zu fünfzehn Monaten signifikant hochreguliert.

Die Expression von Gap43 (siehe Abbildung 18c) war im Hippocampus und Cortex der Wildtypmäuse im Zuge der Alterung von zwei zu sieben (nur Spot SID15193, Hippocampus) und von sieben zu fünfzehn Monaten signifikant herunterreguliert. Bei APP23-Mäusen war die Gap43-Expression von sieben zu fünfzehn Monaten (nicht bei Spot SID873, Cortex) und von einem zu zwei Monaten (nur Spot SID873, Cortex) herunterreguliert.

Zusammengenommen zeigte die altersabhängige Expression von drei ausgewählten Proteinen einen bei APP23- und Wildtypmäusen insgesamt ähnlichen Verlauf. Allerdings existierten einzelne Stadien, in denen sich die Expression stark unterschied.

3.1.3.3 Vergleich mit Proteomstudien humaner Alzheimerpatienten

Um zu prüfen, inwieweit die in den APP23 Mäusen beobachteten Proteinveränderungen auch auf das Gehirngewebe menschlicher Alzheimerpatienten zutreffen, wurden Proteine aus drei verschiedenen Proteomstudien [78,79,80], in denen menschliche *post-mortem* Gehirngewebe von Alzheimerpatienten untersucht worden waren, mit den in den APP23-Mäusen veränderten Proteinen verglichen. Dabei ergab sich eine Überlappung von 73%. Von den 30 innerhalb der drei Studien als verändert gefundenen Proteinen (entspricht 100%), waren 22 Proteine (73%) auch in APP23-Mäusen verändert (Tabelle 12). Von den in ET16 veränderten Proteinen war keines in einer der drei Studien gefunden worden.

Tabelle 12: Proteine, die sowohl im post-mortem Gehirn von humanen Alzheimerpatienten (Referenz 1-3) als auch im Cortex (C) oder Hippocampus (H) der APP23 Mäuse (Altersstadien 1, 2, 7 und 15 Monate) als verändert gefunden wurden.

Referenz	Proteinname	Genname	Altersstadium, Gehirnregion							
			1H	2H	7H	15H	1C	2C	7C	15C
[78]	Gamma-actin	Actg1	▼	■	▼				▲	
[79]	Adenylate kinase 1	Ak1			▼					
[79]	Aldolase 1, A isoform	Aldoa	▲	▲	▲	▲				
[79]	Aldolase 3, C isoform	Aldoc			▼					
[80]	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	Atp5a1					■			
[80]	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	▼		■	▼			■	▼
[78]	NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ddah1		▼	▼	▼				
[79]	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	▲	▲	▲			▲		▼
[79]	Enolase 1, alpha non-neuron	Eno1	▲	▲	▲	▲	▲			
[78]	Enolase 2, gamma neuronal	Eno2	▼	▲	■	▲	▲		▲	▲
[80]	Fatty acid-binding protein, heart	Fabp3		▼		▼				▲
[79]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	▲		▼		▼		▼	
[80]	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	▼			▲	▼			▲
[80]	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 1	Gnb1	▼	▼	▼	▼		▼	▼	
[79]	Heat shock protein 8	Hspa8		▲			▲			▲
[80]	Heat shock protein 65	Hspd1		▲	▲			▲	▲	
[80]	Alpha-Internexin	Ina							▼	
[79]	Pgam1 protein	Pgam1		▼						
[79]	Protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1	Pin1		▲	▲	▲	▼			▲
[79]	Peroxiredoxin-2	Prdx2							▼	▲

[79]	Triosephosphate isomerase	Tpi1	▲	■	▼	▲	▼	▼
[78] [79]	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	Uchl1		■	▼		▼	

▲ hochreguliert

▼ herunterreguliert

■ hoch- und herunterreguliert

Zusammengenommen ergab ein Vergleich der in den APP23-Mäusen veränderten Proteine mit drei Proteomstudien an humanen Alzheimerpatienten eine sehr große Überlappung der Ergebnisse.

3.1.3.4 Immunoblotanalyse der APP-Expression

In einem nächsten Schritt wurde die Expression des humanen, mutierten APP mittels der Immunoblotting-Methode untersucht (Abbildung 19). Hierbei sollte vor allem getestet werden, ob das transgene APP bereits in dem embryonalen Stadium (ET16) der APP23-Mäuse exprimiert wird da dies bisher noch nie gezeigt worden war.

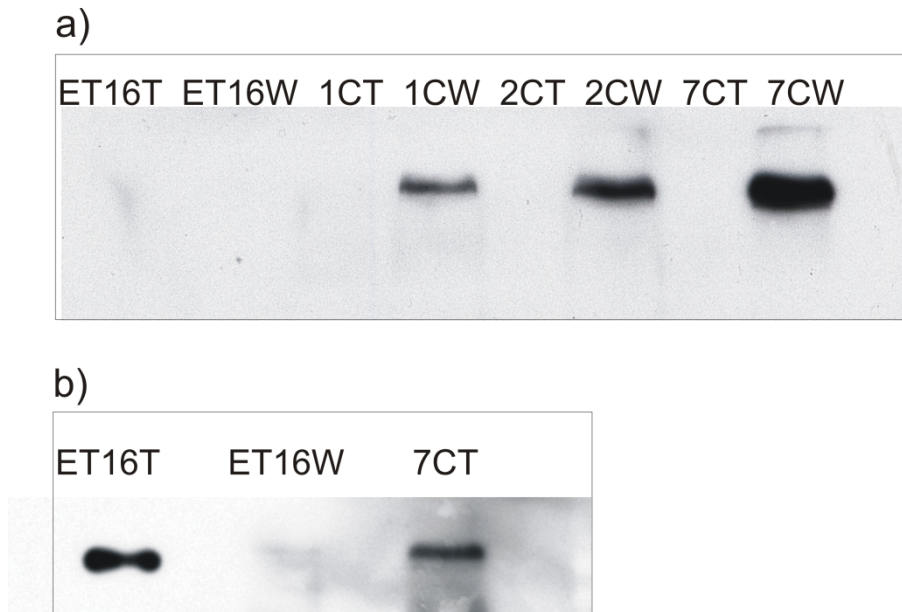


Abbildung 19: Immunoblots von Cortexproben (C) verschiedener Altersstadien (ET16, 1, 2 und 7 Monate) des APP23-Mausmodells. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Klon 6E10) wurde humanes APP sichtbar gemacht. In a) ist die Zeitreihe von ET16 bis 7 Monate zu sehen. Es wurden jeweils alternierend Proben transgener (T) und nicht-transgener Mäuse (W) aufgetragen. Im Vergleich zu den anderen Altersstadien ist in ET16 (bei der verwendeten Probenmenge) noch kein Signal erkennbar. Weiterhin ist erwartungsgemäß nur in transgenen Tieren humanes APP vorhanden. Das Expressionslevel steigt im Laufe des Alterns an. In b) ist ein Signal bei transgenen Mäusen des Altersstadiums ET16 (ET16T) erkennbar, da hier eine größere Probenmenge eingesetzt wurde. Eine verdünnte Cortexprobe eines sieben Monate alten transgenen Tieres (7CT) dient als Positivkontrolle. Bei nicht-transgenen Tieren des Stadiums ET16 (ET16W) ist erwartungsgemäß kein Signal erkennbar.

Das Immunoblotting ergab, dass das transgene APP bereits in dem embryonalen Stadium ET16 vorhanden war, wenngleich auch in einer im Vergleich zu den adulten Stadien deutlich geringeren Konzentration. Die Konzentration des transgenen APP im Cortex der APP23-Mäuse stieg im Verlauf von einem zu sieben Monate alten Tieren an.

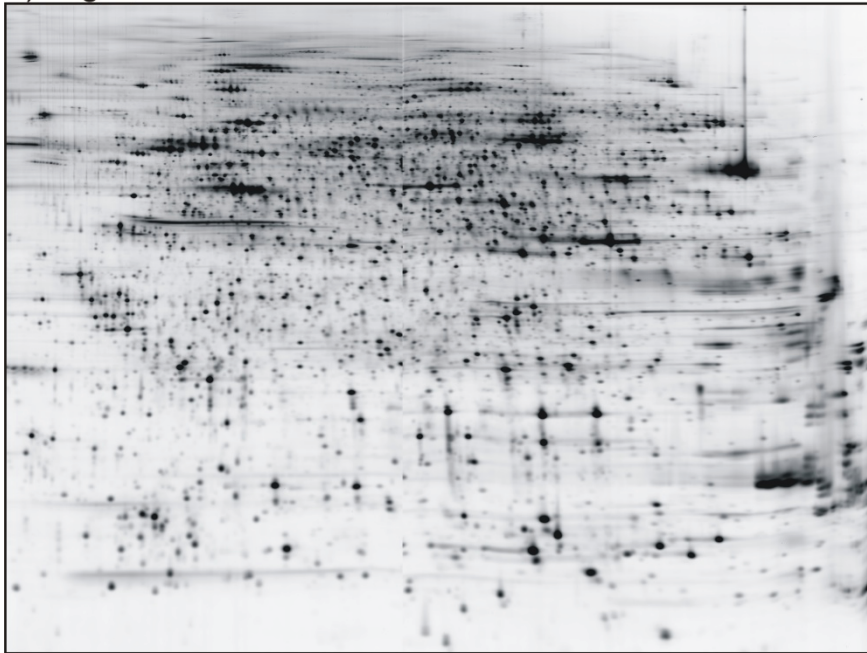
3.2 Untersuchung der embryonalen Gehirnentwicklung

Im Rahmen dieser zweiten Studie wurden Veränderungen in der Proteinexpression des embryonalen Mausgehirns zwischen den Stadien Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5 *p.c.* untersucht. Diese Stadien umfassen im Wesentlichen den Übergang von der Proliferationsphase zur Neurogenese-Phase der Gehirnentwicklung. Parallel zu der Untersuchung des Proteoms wurde in Kooperation mit *J. Beckers*, *M. Irmeler* und Kollegen (Helmholz Zentrum München) auch das Transkriptom untersucht.

3.2.1 Vergleich der Proteomkomplexität

In einem ersten Schritt wurden alle auf den Spotmustern der drei Embryonalstadien erkennbaren Proteinspots manuell gezählt um herauszufinden, in welchem Ausmaß neue, zusätzliche Proteine im Zuge der Neurogenese gebildet werden. Die Spotmuster wurden hierfür mit Hilfe des *Saturation Labellings*, einer sehr sensitiven Färbemethode, erzeugt. Pro Embryonalstadium wurden drei Proteinmuster ausgewertet.

a) Tag 9,5



b) Tag 11,5

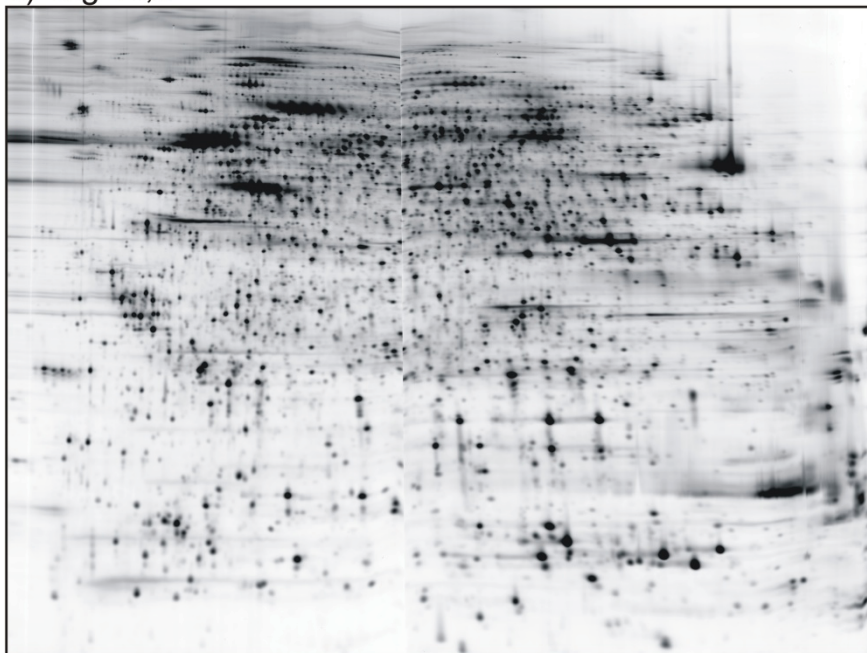


Abbildung 20: Spotmuster der Gehirnprouben von a) 9,5 und b) 11,5 Tage alten Embryonen wie sie auf 2-D-Gelen nach dem *Saturation Labelling* erscheinen. Auf beiden Gelen ist eine ähnliche Anzahl von Spots erkennbar.

Auf den Spotmustern aller drei Embryonalstadien war eine ähnliche Anzahl an Proteinspots zu sehen (Abbildung 20). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (einfaktorielle ANOVA) zwischen den drei Stadien.

Im Detail wurden 3560 ± 649 Spots auf den Gelen des Stadiums Tag 9,5 gezählt. Auf den Gelen der anderen beiden Stadien wurden 3832 ± 166 Spots (Tag 11,5) und 3769 ± 107 Spots (Tag 13,5) gezählt.

Eine Proteinbestimmung der Proteinextrakte von jedem der drei Stadien ergab, dass alle Extrakte einen ähnlichen Proteingehalt von $10 \pm 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufwiesen.

Zusammengenommen wiesen die Proteinmuster aller drei Embryonalstadien keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl an Spots sowie der Gesamtproteinkonzentrationen auf.

3.2.2 Analyse entwicklungsbedingter Proteomveränderungen

Für einen quantitativen Vergleich der Proteinspots wurden die mit Hilfe des *Minimal Labelling* erstellten Proteinmuster miteinander verglichen (DIGE-Methode). Es wurden sechs Gele des Stadiums Tag 9,5 mit acht Gelen des Stadiums Tag 11,5 und fünf Gelen des Stadiums Tag 13,5 verglichen.

Die für den Vergleich bestimmten Proben wurden jeweils mit demselben Fluoreszenzfarbstoff (Cy3) gelabelt. Ausserdem war in jeder Probe ein interner Standard vorhanden (Gemisch aus den Proteinextrakten der Tag11,5-Embryonen, mit Cy5 gelabelt). Die Proteinspots wurden mit der Analysesoftware *Delta2D* erfasst und quantifiziert. Dabei wurden 2004 Proteinspots auf den Gelen aller Stadien erfasst und verglichen (Abbildung 21).

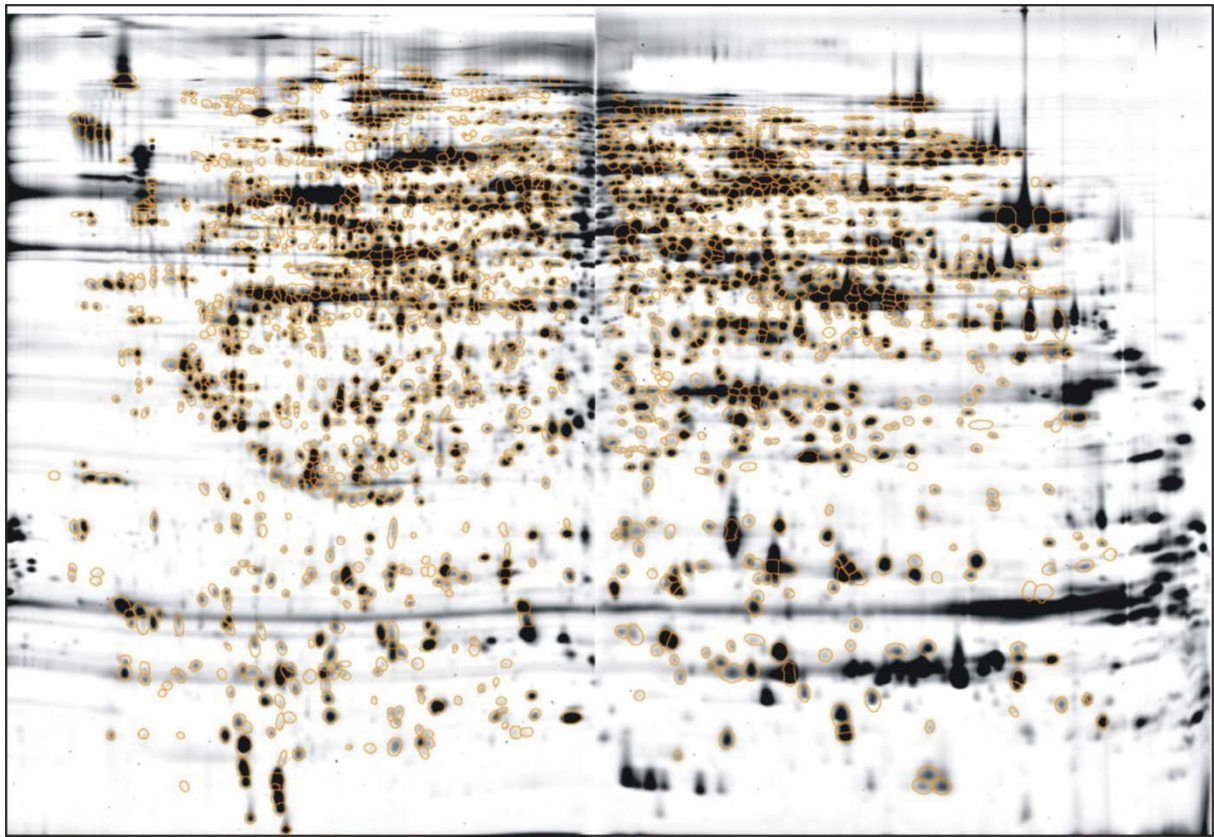


Abbildung 21: Spotmuster einer Cy3-markierten Gehirnprobe von 11,5 Tage alten Mausembryonen. Die orangen Umrandungen markieren die 2004 innerhalb der drei Embryonalstadien verglichenen Proteinspots.

Die statistische Auswertung (einfaktorielle ANOVA) ergab, dass sich 588 Spots zwischen den vier Tage auseinander liegenden Stadien Tag 9,5 und Tag 13,5 signifikant hinsichtlich ihrer Abundanz unterschieden. Zwischen den zwei Tage auseinander liegenden Stadien unterschieden sich 376 (Tag 9,5 gegen Tag 11,5) sowie 302 Spots (Tag 11,5 gegen Tag 13,5) signifikant (Abbildung 22). Prozentual zu der Anzahl der verglichenen Spots entsprechen die Werte einem Unterschied von 29% zwischen Tag 9,5 und Tag 13,5. Zwischen Tag 9,5 und 11,5 unterschieden sich 19% der verglichenen Spots und zwischen Tag 11,5 und Tag 13,5 bestand ein Unterschied von 15%.

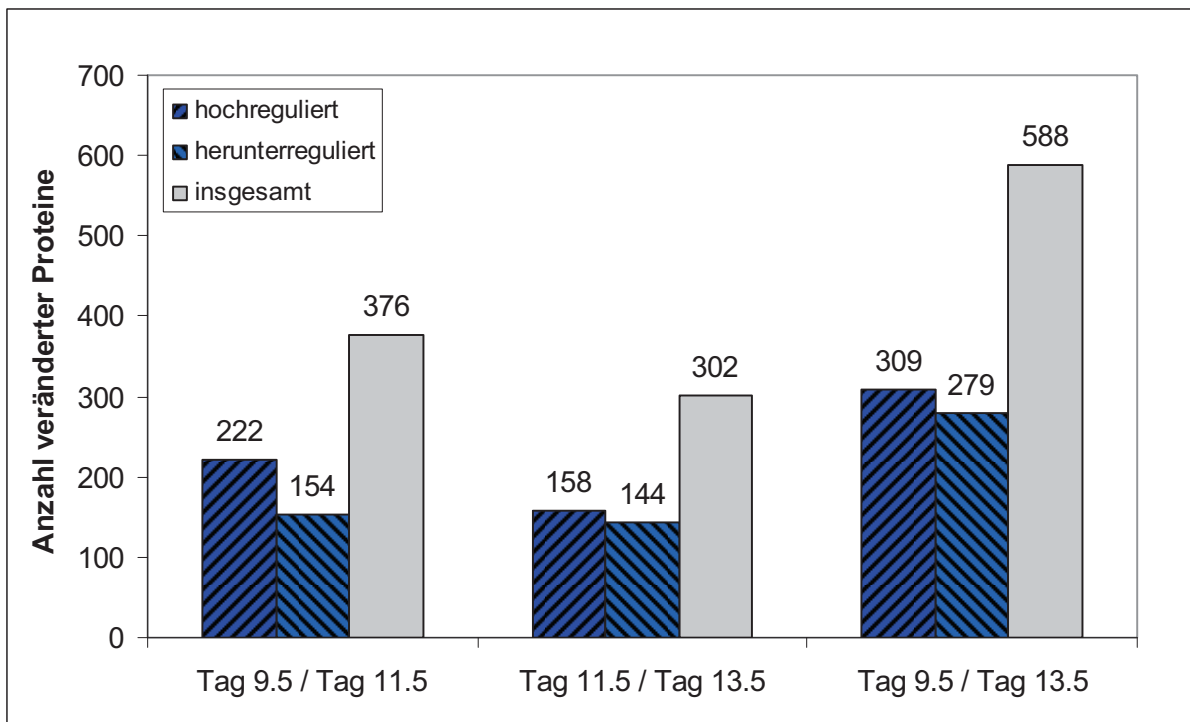


Abbildung 22: Anzahl der bei einem Vergleich der drei Embryonalstadien Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5 (x-Achse) signifikant veränderten Proteinspots (y-Achse). Gezeigt wird die Anzahl der im jeweiligen Vergleich hochregulierten (dunkelblaue, schraffierte Balken) und herunterregulierten (hellblaue, schraffierte Balken) Spots sowie die Gesamtzahl (hellgraue Balken) der veränderten Spots. Bei dem Vergleich von Tag 9,5 gegen Tag 13,5 sind, wie zu erwarten, deutlich mehr Proteinspots verändert als in den zeitlich dichter zusammen liegenden Stadien. Weiterhin sind immer ähnlich viele Spots hoch- wie herunterreguliert.

Von den zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 veränderten Spots waren 222 Spots (11%) an Tag 9,5 hoch- und 154 Spots (8%) an Tag 9,5 herunterreguliert. Die zwischen Tag 11,5 und Tag 13,5 veränderten Spots konnten in 158 (8%) an Tag 11,5 hoch- 144 (7%) an Tag 11,5 herunterregulierte Spots unterteilt werden. Zwischen Tag 9,5 und 13,5 waren 309 Spots (15%) an Tag 9,5 hoch- und 279 Spots (14%) an Tag 9,5 herunterreguliert (Abbildung 22). Bei allen Vergleichen waren also ähnlich viele Spots hoch- wie herunterreguliert.

In einem nächsten Schritt wurde die relativ veränderte Proteinmenge untersucht. Hierfür wurden die Spotvolumina (in Grauwerten) aller signifikant veränderten Proteinspots (auf jeweils einem Proteinmuster) addiert. Das relative Volumen eines Proteinspots entspricht der Konzentration der zugrunde liegenden Proteine in Relation zu der Gesamtkonzentration aller auf dem Proteinmuster sichtbaren Proteine. Dies ist der Fall da sich das Spotvolumen aus der gemessenen Intensität der Fluoreszenz ergibt, die wiederum proportional zu der Menge an markierten Proteinen ist.

Die Messung der relativ veränderten Proteinmenge zwischen den drei Stadien ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Student t-Test). In der Gruppe der zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 veränderten Spots wurden $48,8 \pm 3,1$ Grauwerte an Tag 9,5 und $52,2 \pm 2,0$ Grauwerte an Tag 11,5 gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden für Tag 11,5 gegen Tag 13,5 erzielt ($37,3 \pm 1,9$ Grauwerte an Tag 11,5 und $41,4 \pm 2,6$ Grauwerte an Tag 13,5). Die Analyse der Gruppe Tag 9,5 gegen 13,5 ergab $79,8 \pm 4,8$ Grauwerte an Tag 9,5 sowie $78,3 \pm 3,3$ Grauwerte an Tag 13,5.

Beckers und Irmeler et al. hatten in Kooperation Gehirne von Embryonen derselben Entwicklungsstadien hinsichtlich ihres Transkriptoms untersucht [81,82]. Diese Studie hatte ergeben, dass 10% der untersuchten Transkripte zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 sowie 12% der Transkripte zwischen Tag 11,5 und Tag 13,5 signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Von den zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 veränderten Transkripten waren 5,7% an Tag 9,5 hoch- und 7,7% an Tag 9,5 herunterreguliert. An Tag 11,5 waren im Vergleich zu Tag 13,5 5,1% der Transkripte hoch- und 6,5% der Transkripte herunterreguliert. An Tag 9,5 waren im Vergleich zu Tag 13,5 7,5% der Transkripte hoch- und 6,5% der Transkripte herunterreguliert.

Zusammengenommen ergab der Vergleich der Spotmuster, dass immer ähnlich viele Proteinspots hoch- wie herunterreguliert waren, wenn zwei Embryonalstadien miteinander verglichen wurden. Zwischen der Anzahl hoch- und herunterregulierter Spots bestand maximal eine Differenz von drei Prozent (bei dem Vergleich Tag 9,5 gegen Tag 11,5 betrug die Differenz 3%, bei den anderen beiden Vergleichen betrug sie 1%). Weiterhin war in einem Zeitraum von zwei Tagen immer eine ähnlich große Anzahl von Proteinen (15% bis 19%) verändert, wohingegen fast die doppelte Anzahl an Veränderungen (29%) auftrat, wenn die zwei Embryonalstadien Tag 9,5 und Tag 13,5, zwischen denen vier Tage Entwicklungszeit liegen, miteinander verglichen wurden. Die Analyse der relativ veränderten Proteinmenge sowie die Transkriptomanalyse einer Kooperationsgruppe brachten vergleichbare Resultate.

3.2.3 Identifizierung und Einteilung der varianten Proteine

Aufgrund der großen Anzahl an veränderten Proteinspots wurden 452 zufällig gewählte Spots aus den 2-D-Gelen ausgestochen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Die zur Identifikation ausgewählten Spots waren gleichmäßig über alle Gelregionen verteilt. Von ihnen konnten 300 Spots (Abbildung 23) eindeutig identifiziert werden, was einer Identifizierungsrate von 66% entspricht.

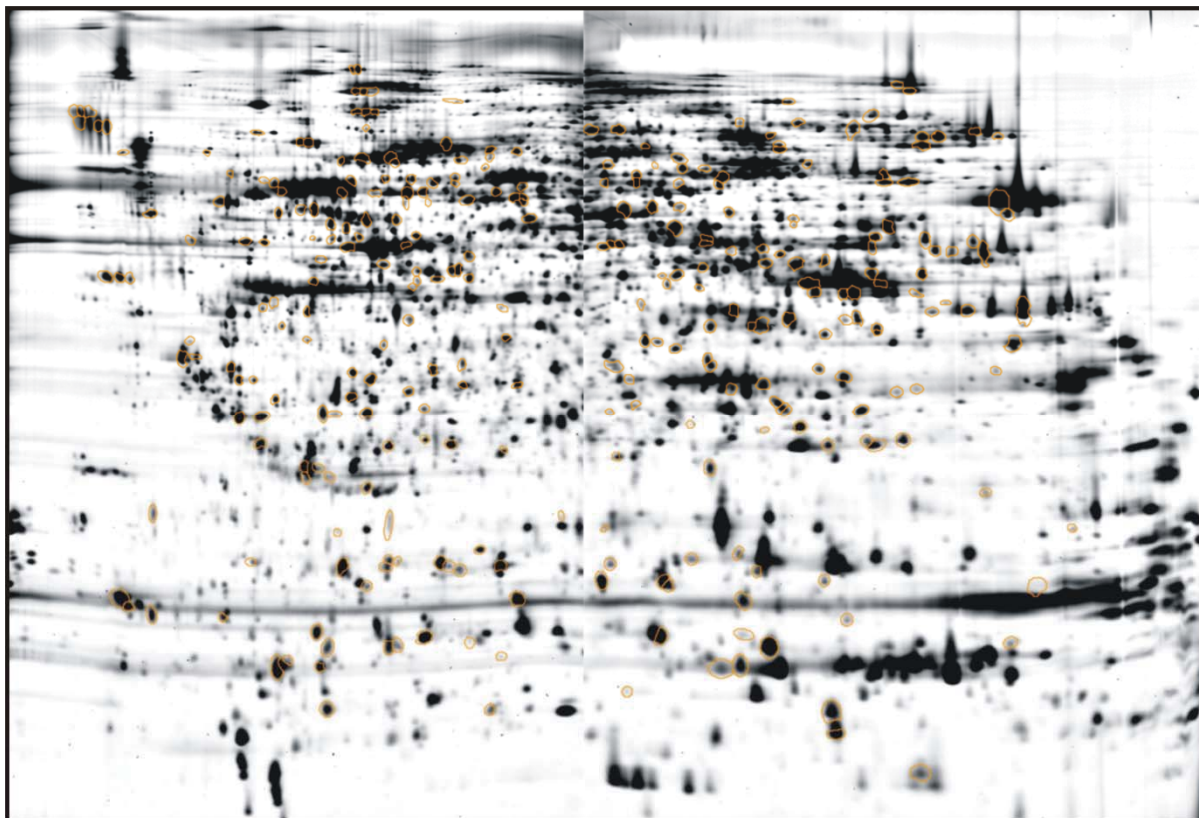


Abbildung 23: Spotmuster einer Cy3-markierten Gehirnpote von 11,5 Tage alten Mausembryonen. Die orangen Umrandungen markieren die identifizierten Proteinspots. Sie sind gleichmäßig über das gesamte Spotmuster verteilt.

Die 300 identifizierten Spots konnten 213 nicht-redundanten Proteinen zugeordnet werden. Da ein Protein auf einem 2-D-Gel aufgrund des Vorhandenseins von Isoformen und Modifikationen in mehreren Spots vorliegen kann, ist die Gesamtzahl der unterschiedlichen Proteine kleiner als die Anzahl an identifizierten Proteinspots.

Von den 213 identifizierten Proteinen waren 72 Proteine signifikant zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 verändert (21 hoch und 51 herunterreguliert). Zwischen Tag 11,5 und Tag 13,5 waren 51 Proteine (25 hoch- und 26 herunterreguliert) und zwischen Tag 9,5 und Tag 13,5 waren 72 Proteine (27 hoch und 45 herunterreguliert) verändert. Weiterhin waren 119 der identifizierten Proteine zwischen den drei Stadien nicht signifikant verändert. Eine ausführliche Liste aller identifizierten Proteine wird im Anhang (Tabelle 16) aufgeführt.

3.2.3.1 Funktionelle Kategorisierung

Um einen Überblick über die zellulären Funktionen der identifizierten Proteine zu erhalten, wurden die identifizierten Proteine hinsichtlich ihrer Funktionen in sieben funktionelle Gruppen unterteilt (Tabelle 13). Die funktionellen Kategorien sind an die KEGG-Pathways angelehnt. Die Einteilung der Proteine in die jeweiligen

Kategorien erfolgte gemäß der GO–Annotationen der einzelnen Proteine. Des Weiteren wurden manche Proteine anhand einer Literaturrecherche eingeteilt. Für die Einteilung der Proteine wurde zudem der Online-Dienst *Webgestalt* [76] genutzt.

Tabelle 13: Prozentuale Einteilung der signifikant zwischen den Altersstadien Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5 veränderten und unveränderten Proteine in mehrere funktionelle Gruppen.

Funktionelle Kategorie	hochreguliert			herunterreguliert			Unverändert alle Vergleiche
	11,5 / 9,5	13,5 / 11,5	13,5 / 9,5	11,5 / 9,5	13,5 / 11,5	13,5 / 9,5	
1. Transkription, Translation, Nukleotid-Metabolismus	13	12	15	38	48	24	31
2. Metabolismus	23	27	21	29	4	24	20
2.1 KH-Metabolismus	4	8	6	17	0	10	6
2.2 Energie-Metabolismus	4	0	6	4	0	3	6
2.3 AS-Metabolismus	2	4	2	8	4	10	6
2.4 Lipid-Metabolismus	13	15	6	0	0	0	2
2. Zytoskelett	12	4	17	4	7	3	12
3. Signaltransduktion	0	8	9	8	11	21	2
4. Faltung, Sortierung	10	12	11	21	4	14	6
6. Abbau	10	4	6	0	15	3	7
7. Neuron	8	12	6	0	0	3	3
8. Zellwachstum und -tod	2	4	0	0	0	0	3

Die funktionelle Einteilung der Proteine ergab, dass die meisten der, im Laufe der Entwicklung veränderten oder unveränderten Proteine, den Gruppen „Transkription, Translation, Nukleotid-Metabolismus“, „Metabolismus“ und „Faltung, Sortierung“ angehörten.

Im Vergleich zu den im Laufe der Entwicklung herunterregulierten und unveränderten Proteine waren die hochregulierten Proteine stärker in den funktionellen Gruppen „Lipid-Metabolismus“, „Zytoskelett“ und „Neuron“ vertreten.

Auch die Transkriptomdaten wurden mit Hilfe einer GO-Analyse hinsichtlich der Funktionen veränderter Transkripte untersucht [81]: Innerhalb der im Zuge der Entwicklung herunterregulierten Transkripte waren die Kategorien „Metabolismus“ und „Zellzyklus“ signifikant angereichert. Innerhalb der an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 quantitativ hochregulierten Transkripte waren jedoch die mit der Neurogenese assoziierten GO-Annotationen „Axonformierung“, „Dendritenmorphogenese“, „Synapsenformation“ sowie „Notch- und Wnt-Signalkaskaden“ signifikant angereichert.

Zusammengenommen hat die funktionelle Kategorisierung der Proteom- und Transkriptomdaten ergeben, dass im Zuge der Entwicklung viele neuronenspezifische Proteine hochreguliert waren wohingegen Vertreter der übrigen funktionellen Kategorien bei veränderten und unveränderten Proteinen gleichermaßen vertreten waren.

3.2.3.2 Analyse ausgewählter Proteine

Um die molekularen Veränderungen im Zuge der Neurogenese genauer zu untersuchen, wurde die Expression einzelner wichtiger Proteine in Tabelle 14 aufgelistet. Die Veränderung der Expression einzelner Transkripte, die in denselben Embryonalstadien untersucht worden waren [81], wurden ergänzend mit aufgelistet.

Tabelle 14: Quantitative Expressionsunterschiede ausgewählter Proteine und Transkripte (mRNA, Ergebnisse einer Kooperationsgruppe) zwischen den drei Embryonalstadien Tag 9,5; Tag11,5 und Tag13,5.

Genname	Quantitativer Unterschied (mRNA)		
	9.5 / 11.5	11.5 / 13.5	9.5 / 13.5
<i>Zytoskelett:</i>			
Arpc5	0.9**	0.9	0.8
Marcks	0.4**	1.4	0.5**
Gap43	0.7	0.2**	0.2**
Basp1	0.6	0.8	0.5**
RhoA	1.2	0.6*	0.7

Cdc42	0.4*	0.4*	1.5*; 0.1*
Rac1	0.7	1.3	0.9
<i>Determinierende Faktoren:</i>			
Tpt1	0.9	1.0	1.0
CtBP1	0.7	1.1	0.8
Notch1	0.5**	1.8**	0.5**
Hes5	0.4**	3.6**	1.4
Hes1	1.6**	0.6**	0.9
Rest	2.3**	0.4**	0.9
Neurog1	1.1	4.3**	4.8**
Neurog2	0.2	0.9	0.2**
Quantitativer Unterschied (Protein)			
<i>Zytoskelett:</i>			
Arpc5	0.75*	1.01	0.76**
Marcks	0.52	0.48	0.25
Gap43	0.98	0.83	0.82**
Basp1	0.47**	0.82	0.38
<i>Determinierende Faktoren:</i>			
Tpt1	1.43**	1.50**	2.15*
CtBP1	0.70*	1.15	0.8

* $p \leq 0.05$

** $p \leq 0.1$

Wie in Tabelle 14 gezeigt, war die Expression mehrerer mit dem Zytoskelett assoziierter Proteine im Laufe der Entwicklung hochreguliert. Dies wurde auch auf Transkriptebene gezeigt. Weiterhin war die Expression der Proteine *Translationally controlled tumor protein* (TCTP, Genname *Tpt1*) und *C-terminal binding protein 1* (Genname *CtBP1*) im Zuge der Entwicklung verändert. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle innerhalb von entwicklungssteuernden Signalkaskaden und gelten daher als determinierende Faktoren. Die Expression von

TCTP war im Zuge der Entwicklung stark herunterreguliert und die Expression des *CtBP1* war von Tag 9,5 zu Tag 11,5 hochreguliert.

Des Weiteren war die Expression mehrerer determinierender Faktoren auf Transkriptebene verändert. Das Transkript des zentralen Proteins der Notch-Signalkaskade, des Notch-Rezeptors (Genname *Notch1*), war an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 hochreguliert und im Vergleich zu Tag 13,5 herunterreguliert. Ein weiterer Bestandteil der Notch-Signalkaskade, das Protein *Hairy and enhancer of split 5* (Genname *Hes5*) war auf Transkriptebene in derselben Weise verändert. Dahingegen war die Expression des Proteins *Hairy and enhancer of split 1* (Genname *Hes1*) gegensätzlich reguliert. Das Transkript war an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 herunterreguliert und im Vergleich zu Tag 13,5 hochreguliert. Ein Bestandteil der Wnt-Signalkaskade, das *CtBP1* zeigte auf Transkriptebene dieselben Expressionsraten wie auf Proteinebene, jedoch erreichte die Expressionsveränderung hier kein Signifikanzniveau. Dagegen war ein weiterer Bestandteil der Wnt-Signalkaskade, der *Neuron restrictive silencer factor/repressor element 1 Transkription factor* (Genname *Rest*) auf Transkriptebene signifikant verändert. Er war an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 herunterreguliert und im Vergleich zu Tag 13,5 hochreguliert. Weiterhin war auch die Expression zweier Zielgene des Notch- sowie des Wnt-Signalwegs, verändert. Das Transkript von *Neurogenin1* (Genname *Neurog1*) war an Tag 13,5 im Vergleich zu Tag 9,5 und 11,5 herunterreguliert und das Transkript von *Neurogenin2* (Genname *Neurog2*) war an Tag 13,5 im Vergleich zu Tag 9,5 hochreguliert.

Um die Expressionsdaten einzelner Proteine/Transkripte zu verifizieren wurden Immunoblots von drei besonders wichtigen Proteinen angefertigt (Abbildung 24).

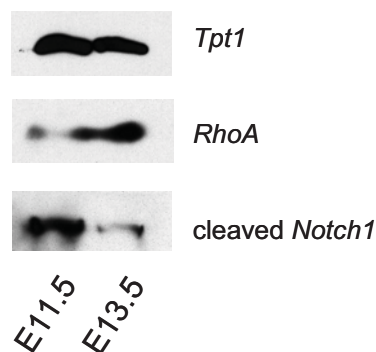


Abbildung 24: Immunoblots von drei Proteinen (Gennamen *Tpt1*, *RhoA* und *cleaved Notch1*) auf Gehirnproben von 11,5 (linke Seite) und 13,5 (rechte Seite) Tage alten Mausembryonen. Bei Tag 11,5 ist ein im Vergleich zu Tag 13,5 stärkeres Signal der Proteine TCTP (*Tpt1*) und *cleaved Notch1* erkennbar, das Signal von *RhoA* ist bei Tag 13,5 stärker als bei Tag 11,5.

Mit Hilfe der Immunoblot-Methode konnte der Expressionsunterschied des Proteins TCTP zwischen Tag 11,5 und Tag 13,5 reproduziert werden. Außerdem konnte der Expressionsunterschied zweier wichtiger Signalproteine, der Proteine *RhoA* sowie der aktiven Form des Notch1-Rezeptors (*cleaved Notch1*) auf

Proteinebene reproduziert werden. Das *cleaved Notch1* war an Tag 13,5 im Vergleich zu Tag 11,5 herunterreguliert. Die Expression von *RhoA* war dagegen an Tag 13,5 im Vergleich zu Tag 11,5 deutlich erhöht.

Zusammengenommen waren im Verlauf der Entwicklung mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine und Transkripte meist quantitativ hochreguliert. Zudem war die Expression verschiedener determinierender Faktoren im Zuge der Entwicklung signifikant verändert.

3.2.3.3 Vergleich der Proteom- und Transkriptomdaten

Neben dem Vergleich einzelner Proteine auf Transkripte wurde auch der gesamte Proteomdatensatz (identifizierte Proteinspots) mit dem Transkriptomdatensatz (Kooperation mit *Irmeler, M.* und *Beckers, J.*) verglichen (Abbildung 25). Hierfür wurden Proteine den entsprechenden Transkripten mit Hilfe der Gennamen zugeordnet. Es wurde die Richtung der Veränderung (signifikant hochreguliert, signifikant herunterreguliert oder unverändert) verglichen.

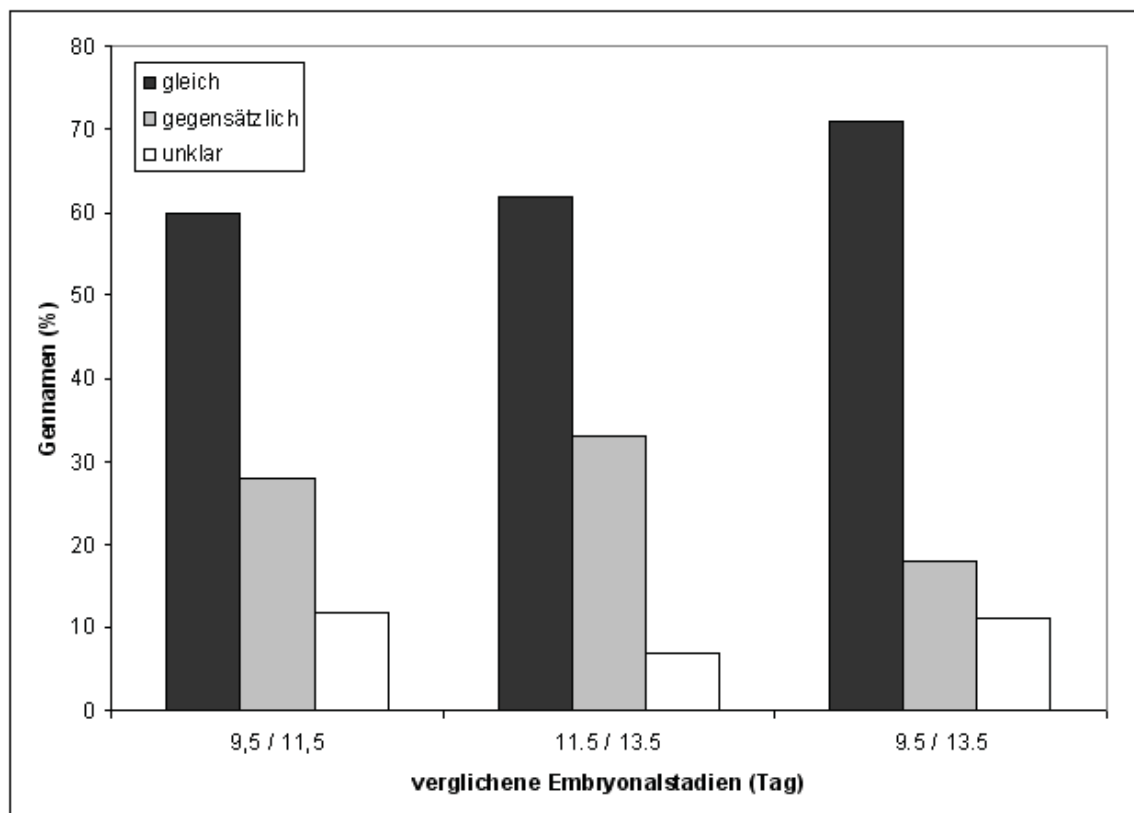


Abbildung 25: Vergleich der Expressionsveränderung von Proteinen mit der der entsprechenden Transkripte zwischen den drei Embryonalstadien Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5. Die Mehrzahl der Proteine ist mit den Transkripten koreguliert (gleich, schwarze Balken). Einige Proteine sind gegensätzlich zu den Transkripten reguliert (graue Balken) und die Koregulation mancher Proteine und Transkripte ist unklar (weisse Balken).

Der Vergleich der Proteom- und Transkriptomdaten ergab, dass 60-70% der Proteine und Transkripte im Zuge der Embryonalentwicklung koreguliert waren. Nur 20-30% der Proteine waren zwischen den untersuchten Embryonalstadien gegensätzlich zu den entsprechenden Transkripten reguliert. Des Weiteren war die Korrelation von circa 10% der Proteine und Transkripte unklar, da hier verschiedene Isoformen desselben Proteins vorlagen von denen einige hinsichtlich ihrer Abundanz den Transkripten entsprachen, andere jedoch nicht.

Zusammengenommen hat der Vergleich der gesamten Proteom- und Transkriptomdaten ergeben, dass die Mehrzahl der Proteinveränderungen (60-70%), die zwischen den Embryonalstadien Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5 aufgetreten waren, auf Transkriptomebene reproduziert werden konnten.

4 Diskussion

4.1 Proteomveränderungen im Gehirn der APP23-Mäuse

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde mit Methoden der Proteomanalyse das APP23-Mausmodell für die AK untersucht. Dieses Mausmodell exprimiert humanes APP mit der so genannten Schwedischen Mutation. Erste Amyloidablagerungen sind bei APP23-Mäusen im Alter von sechs Monaten erkennbar [65]. Da insbesondere über frühe Altersstadien von AK-Mausmodellen bis heute erst wenig bekannt ist, wurden sowohl frühe als auch späte Altersstadien der APP23-Mäuse untersucht. Angefangen mit dem embryonalen Stadium ET16 wurden die adulten Altersstadien 1, 2, 7 und 15 Monate analysiert. Für alle Stadien bis auf ET16 (hier wurde nur die Cortexregion untersucht) wurden die Gehirnregionen Cortex sowie Hippocampus untersucht, da diese Regionen für die AK von besonderer Relevanz sind. Somit wurde erstmals ein Lebensprofil des hippocampalen und cortikalen Proteoms der APP23-Mäuse erstellt. Auf diese Weise konnte der gesamte Krankheitsverlauf auf Proteomebene untersucht werden. Tatsächlich erbrachte die Studie interessante globale Erkenntnisse über die frühe, klinisch stille Phase der AK.

4.1.1 Auffälliger Peak im hippocampalen Proteomprofil zwei Monate alter APP23-Mäuse

Ein Vergleich der Proteinmuster ergab, dass sich *innerhalb* aller untersuchten Altersstadien circa 50 bis 80 Proteine quantitativ zwischen APP23- und Wildtypmäusen unterschieden. Eine unerwartete Abweichung zeigte sich jedoch im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse. Hier war eine deutlich höhere Anzahl von 140 Proteinen verändert.

Um diesen unerwarteten Befund weiter zu untersuchen, wurden die Proteinveränderungen *zwischen* den Altersstadien untersucht. Interessanterweise ergab die Untersuchung dieser entwicklungsbedingten Proteomveränderungen, dass der Peak in der Anzahl varianter Proteine (im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse) dadurch zustande kommt, dass im Hippocampus der APP23-Mäuse zwischen den Altersstadien ein Monat bis sieben Monate, Proteomveränderungen weitgehend ausgeblieben waren. In Wildtypmäusen wurden jedoch über denselben Zeitraum viele Proteinveränderungen gefunden. Bei allen anderen Vergleichen konnte kein derartiger Unterschied entdeckt werden.

APP spielt in Prozessen der neuronalen Plastizität, die im Hippocampus besonders ausgeprägt sind, eine wichtige Rolle [22]. Das beobachtete Ausbleiben von entwicklungsbedingten Veränderungen im hippocampalen Proteom der APP23-Mäuse könnte demnach mit einer Störung der neuronalen Plastizität in Verbindung stehen.

Die murine Entwicklungsphase zwischen einem Monat und zwei Monaten beinhaltet den Übergang von dem Jugend- in das Erwachsenenstadium. Während der Jugendphase (Adoleszenz) sind mesocorticolimbische Gehirnareale von Mäusen als auch von Menschen höchstgradig plastisch [83,84]. Mit dem Übergang zum Erwachsenenstadium nimmt diese Plastizität langsam ab. Mechanismen, die zu einer Erhöhung der Plastizität beitragen, sind die Überproduktion und das Absterben von Synapsen und deren aktivitätsabhängige Modulation sowie die Neubildung von Neuronen in bestimmten Gehirnarealen [84,85]. Diese Mechanismen spiegeln sich auch auf molekularer Ebene in Form von Genexpressionsveränderungen wieder. Beispielsweise konnten in der Vergangenheit bei einem Vergleich des hippocampalen Transkriptoms zwischen den Altersstadien zwei und fünfzehn Monate zahlreiche quantitative Veränderungen mit der Abnahme der kognitiven Leistungen älterer Mäuse in Verbindung gebracht werden [86].

4.1.2 Herunterregulation plastizitätsassoziierter Proteine im Hippocampus adoleszenter APP23-Mäuse

Um zu prüfen, ob das beobachtete Ausbleiben entwicklungsbedingter Veränderungen im hippocampalen Proteom ein bis sieben Monate alter APP23-Mäuse tatsächlich mit einem Defizit in der neuronalen Plastizität einhergehen könnte, wurde die altersabhängige Expression neuronen- und synapsenspezifischer Proteine genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die meisten dieser Proteine in transgenen Mäusen herunterreguliert waren, wobei der Großteil aller Proteine im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse herunterreguliert war. Im Folgenden werden die neuronenspezifischen Proteine ausführlich diskutiert.

4.1.2.1 Bestandteile des neuronalen Zytoskeletts

Neuromodulin (Genname *Gap43*) ist ein mit dem Zytoskelett assoziiertes Protein. Es war im Hippocampus und Cortex adoleszenter APP23-Mäusen herunterreguliert. Aufgrund seiner wichtigen Rolle in der Gehirnplastizität wurde auch die altersabhängige Expression von *Neuromodulin* näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *Neuromodulin* im Laufe des Alterns bei Wildtyp- und APP23-Mäusen deutlich abnahm. Zudem war es im Verlauf der embryonalen Neurogenese hochreguliert.

Neuromodulin ist wie das *Brain acid soluble protein 1* (Genname *Basp1*), das im Cortex einen Monat und fünfzehn Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert war, ein wichtiges synaptisches Signalprotein, das einlaufende Signale direkt auf Effektoren des Zytoskeletts transduziert. Zudem sind beide Proteine wichtige Bestandteile neuronaler Wachstumskegel [87]. *Neuromodulin* kann das Auswachsen neuer Fortsätze nach der Verletzung von Neuronen induzieren und seine Überexpression bewirkt die spontane Bildung neuer Synapsen. Weiterhin ist eine hohe Konzentration an *Neuromodulin* vor allem in den hochplastischen Regionen des Gehirns, dem limbischen System und den Assoziationscortices zu finden. Es wird daher auch als Markerprotein für Neurogenese und neuronale Plastizität angesehen [88]. Eine frühe Herunterregulierung von *Neuromodulin* wurde bereits in Gehirnen von Alzheimerpatienten nachgewiesen [89].

Der Expressionsverlauf von Neuromodulin, einem Markerprotein für neuronale Plastizität, weist also darauf hin, dass die neuronale Plastizität der APP23-Mäuse während der Adoleszenz vermindert ist.

Ein weiterer Bestandteil des Zytoskeletts ist *Septin-7* (Genname *Sept7*). Septine spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts, indem sie mit Membranen assoziieren und als Grundgerüst für zytoskelettbindende Proteine agieren. Sie werden von verschiedenen Signalkaskaden angesteuert. Septine sind daher von großer Bedeutung für die Bildung und Aufrechterhaltung von Geweben [90]. *Septin-7* ist ein Mitglied der Septin-Familie. Es ist in neuronalen Wachstumskegeln und Verzweigungspunkten sich entwickelnder Neurone lokalisiert. In erwachsenen hippocampalen Neuronen wurde kürzlich gezeigt, dass *Septin-7* bogen- oder ringförmige Strukturen an den Ursprüngen dendritischer Spines formt [91,92]. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Herunterregulation der *Septin-7*-Expression die Verzweigung neuronaler Dendriten vermindert und die Morphologie dendritischer Spines verändert [91].

Septin-7 war im Hippocampus aller Altersstadien sowie im Cortex einen Monat alter APP23-Mäuse herunterreguliert. Im Cortex sieben Monate alter APP23-Mäuse war es hochreguliert. Die vorwiegende Herunterregulation von *Septin7* ist ein weiterer Hinweis auf eine Störung der hippocampalen Plastizität bei APP23-Mäusen.

Ein viertes, mit dem Zytoskelett assoziiertes Protein ist CRMP2 (*Dihydropyrimidase-related protein 2*, Genname *Dpysl2*). Es reguliert den Zusammenbau von Microtubuli in Neuronen und ist in die Neuritogenese involviert [93]. Die Rho-GTPasen *RhoA* (*Ras homolog gene family, member A*) und *Rac1* (*Rho family, small GTP binding protein Rac1*) regulieren dabei durch dessen Phosphorylierung die Funktionsweise von CRMP2. In Gehirnen von Alzheimerpatienten wurde bereits hyperphosphoryliertes CRMP2 nachgewiesen [94]. Zudem ist bekannt, dass diese Hyperphosphorylierung durch die Überexpression von APP oder durch ein APP-Prozessierungsungleichgewicht ausgelöst werden kann und in Mausmodellen für die AK schon im Alter von zwei Monaten auftritt [94]. Neueste Studien zeigen zudem *in vitro*, dass A β die Aktivität von Rho-GTPasen erhöht, wodurch es zu einer Hyperphosphorylierung und dem damit verbundenen Funktionsverlust von CRMP2 kommt. Auf diese Weise inhibiert A β das Auswachsen von Neuriten bei der Neurogenese [95].

CRMP2 war auch in vielen jüngeren Stadien der APP23-Mäuse hochreguliert. Dies könnte auch hier von einer Hyperphosphorylierung und einem damit verbundenen Funktionsverlust von CRMP2 in den APP23-Mäusen herrühren.

4.1.2.2 Der neurotrophe Faktor Neudesin

Das Protein Neudesin (*Neuron derived neurotrophic factor*, Genname *Nenf*) spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung und agiert als neurotropher Faktor für primäre Neurone in Zellkultur sowie neuronale Vorläuferzellen [96].

Neudesin war im Hippocampus zwei Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert. Dies könnte ein Hinweis auf eine verminderte Neurogeneserate im Hippocampus adoleszenter APP23-Mäuse sein.

4.1.2.3 Synapsenspezifische Proteine

Die Proteine *Complexin-1* und *-2* (Gennamen *Cplx1*, *Cplx2*) sind spezifisch in Synapsen lokalisiert. Complexine sind mit dem SNARE-Komplex (*N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor protein complex*) assoziiert und modulieren die Neurotransmitterausschüttung aus präsynaptischen Neurotransmittervesikeln [97,98]. *Complexin-1* ist dabei vor allem in axosomatischen, also inhibitorischen Präsynapsen vorhanden wohingegen *Complexin-2* vor allem in axodendritischen, also exzitatorischen Präsynapsen zu finden ist [99,100,101]. Die beiden Complexine werden aufgrund ihrer Spezifität auch als Markerproteine für inhibitorische beziehungsweise exzitatorische Synapsen verwendet.

Complexin-1 war im Hippocampus und Cortex zwei Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert. *Complexin-2* war dagegen im Cortex zwei und sieben Monate alter APP23-Mäuse hochreguliert. Diese gegensätzliche Veränderung der beiden Complexine deutet auf eine Verschiebung des Gleichgewichts inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen im Hippocampus und Cortex der APP23-Mäusen hin.

Der SNARE-Komplex steuert die Fusion exozytischer Vesikel mit der Zellmembran. Ein direkter Bestandteil des SNARE-Komplexes ist das *Synaptosomal associated protein 25* (Genname *Snap25*) [102]. Es ist an der präsynaptischen Plasmamembran lokalisiert und war im Hippocampus sieben Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert. Weitere Bestandteile des SNARE-Komplexes sind das *Beta-* und das *Gamma-soluble NSF attachment protein* (Gennamen *Napb* und *Napg*) [103,104]. Das *Beta-soluble NSF attachment protein* war im Hippocampus sieben Monate alter Tiere herunterreguliert, das *Gamma-soluble NSF attachment protein* war im Hippocampus zwei und fünfzehn Monate alter Mäuse sowie im Cortex sieben Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert. Auch das *Syntaxin binding protein 1* (Munc18-1, Genname *Stxbp1*) ist Teil der Exozytose-Maschinerie. Es wird als eine Art Steuerzentrum für den SNARE-Komplex angesehen [105] und war im Hippocampus sieben Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert. Zusammengefasst waren also viele wichtige Bestandteile der synaptischen Exozytosemaschinerie in adoleszenten APP23-Mäusen herunterreguliert. Dies könnte mit einer verminderten Synapsenzahl in Verbindung stehen.

Das Protein *Pacsin1* (*Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1*, Genname *Pacsin1*) war im Hippocampus zwei und sieben Monate alter sowie im Cortex einen Monat alter APP23-Mäusen herunterreguliert.

Dieses neuronenspezifische Protein spielt in der Endozytose synaptischer Vesikel eine wichtige Rolle [106]. Ein Verlust von *Pacsin1* an Synapsen wurde bereits mit der aberranten Neurotransmission bei Patienten mit der Huntingtonschen Krankheit in Verbindung gebracht [106,107]. Die Herunterregulation von *Pacsin1* im Gehirn der APP23-Mäuse könnte ein weiterer Hinweis auf eine Verminderung der Synapsenzahl sein.

Synapsine sind neuronenspezifische Phosphoproteine, die an der synaptischen Vesikelmembran lokalisiert sind und eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und Neurotransmitterfreisetzung spielen. Sie gelten weiterhin als

Modulatoren der synaptischen Stärke, da sie Neurotransmittervesikel in aktiven Zonen miteinander verbinden [108].

In den APP23-Mäusen waren insgesamt drei verschiedene Synapsine in mehreren Stadien verändert. Da Synapsine auf den 2-D-Gelen aufgrund von posttranslationalen Modifikationen in mehreren Spots vorlagen, die oftmals gegensätzliche Richtungen der Veränderung aufwiesen, ist es schwer hier eine Aussage über die Richtung der Veränderung zu machen. In diesem Zusammenhang wäre eine detaillierte Untersuchung der Modifikationen sinnvoll.

Ein zentraler Bestandteil postsynaptischer Kompartimente ist das *Postsynaptic density protein 95* (PSD-95, Genname *Dlg4*) [109]. Es war im Cortex von einen Monat und zwei Monate alten sowie im Hippocampus zwei Monate alter APP23-Mäuse herunterreguliert. Dies deutet erneut auf eine Abnahme der Synapsenzahl bei adoleszenten APP23-Mäusen hin.

Der *Diazepam binding inhibitor 2* (DBI2, Genname *Dbi*) ist ein Modulator des GABA(A)-Rezeptors. Im Hippocampus einen Monat und fünfzehn Monate alter sowie im Cortex fünfzehn Monate alter APP23-Mäuse war DBI2 hochreguliert. Im Hippocampus zwei Monate alter sowie im Cortex sieben Monate alter APP23-Mäuse war er herunterreguliert.

Mäuse, die DBI2 überexprimieren, zeigen Defizite im Hippocampus-abhängigen Lernen und eine erhöhte Konzentrationen dieses Proteins konnte in der Zerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten nachgewiesen werden [110,111]. Die veränderte Expression des DBI2 in den APP23-Mäusen könnte daher mit einer kognitiven Störung in Verbindung gebracht werden.

Die überwiegende Herunterregulierung plastizitätsassoziierter Proteine im Hippocampus und Cortex lässt auf eine eingeschränkte neuronale Plastizität der APP23-Mäuse schließen. Im Hippocampus zwei Monate alter Mäuse war hierbei die größte Anzahl an den erwähnten Proteinen verändert. In diesem Stadium war dementsprechend auch der Peak in der Anzahl an Proteomunterschieden zwischen APP23- und Wildtypmäusen vorhanden.

4.1.3 Beeinträchtigung der adoleszenten hippocampalen Plastizität

Der Verlust und die Dysfunktion von Synapsen sind das beste Korrelat zu dem Status der Demenz bei humanen Alzheimerpatienten [12]. Vor kurzem wurde bekannt, dass lösliches A β bereits in geringen Konzentrationen die Anzahl dendritischer Spines von hippocampalen Neuronen verringern und deren Morphologie verändern kann [112,113]. Die Konzentration an löslichem A β ist in dem APP23-Mausmodell sowie in vielen weiteren Mausmodellen für die AK erhöht.

Tatsächlich wurde in den Gehirnen von verschiedenen Mausmodellen für die AK bereits eine Reduktion in der Dichte neuronaler Dendriten sowie eine Reduktion in der Anzahl dendritischer Spines beobachtet [114,115]. Eine Forschergruppe zählte beispielsweise dendritische Spines hippocampaler Neurone von zwei unterschiedlichen Mausmodellen für die familiäre AK, die, wie das APP23-Mausmodell auf der Expression von mutiertem APP beruhen [115]. Bei beiden Mausmodellen war die Konzentration an löslichem A β erhöht. Die Anzahl der dendritischen Spines war in den transgenen Mäusen geringer als in Wildtypmäusen. Interessanterweise war der größte Unterschied jedoch in jungen, zwei bis fünf Monate alten Mäusen, beobachtet worden, wohingegen in älteren Mäusen, die bereits Amyloidplaques ausgebildet hatten, kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen zu finden war. Zusätzlich ging aus den Ergebnissen hervor, dass die Anzahl der Spines in den transgenen Mäusen aller Altersstadien relativ ähnlich war, wohingegen in jüngeren Wildtypmäusen eine im Vergleich zu den älteren Mäusen höhere Zahl dendritischer Spines gezählt wurde. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Synapsenverlust in Mausmodellen für die AK nur in adoleszenten Mäusen beobachtet werden kann, da diese ein Höchstmaß an Plastizität aufweisen.

Analog zu diesen Ergebnissen könnte die beobachtete Herunterregulation plastizitätsassoziierter Proteine bei adoleszenten APP23-Mäusen mit einer Verminderung der neuronalen Plastizität, die in jenem Zeitraum sehr ausgeprägt ist, einhergehen. Zudem wurde eine allgemeine Reduktion der entwicklungsbedingten Proteomveränderungen bei APP23-Mäusen (im Zeitraum von einem Monat bis sieben Monaten) beobachtet. Dem könnte das Ausbleiben eines natürlichen Peaks in der Plastizität während der Adoleszenz der Mäuse zugrunde liegen.

Weiterhin könnte auch eine Verminderung der Neurogeneserate erfolgt sein. In der Vergangenheit wurde bereits eine Reduktion in der Zellproliferationsrate im hippocampalen *Gyrus dentatus* eines Mausmodells für die AK festgestellt [116]. Interessanterweise wurde dies bereits bei drei Monate alten Tieren, die noch keine Amyloidplaques ausgebildet hatten, beobachtet. Auch andere Forschergruppen beobachteten im *Gyrus dentatus* eines Mausmodells für die AK eine veränderte Neurogeneserate bei drei Monate alten transgenen Tieren. Allerdings war die Neurogeneserate in transgenen Tieren erhöht [117,118]. Bei älteren Tieren (5, 9 und 11 Monate) wurde hingegen mehrfach eine im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen erniedrigte Neurogeneserate im Hippocampus beobachtet [116,117,119,120].

Alles in allem sind die hier gezeigten Ergebnisse analog zu den Resultaten neuester Studien, in denen gezeigt wurde, dass sowohl der Verlust von Synapsen als auch Lerndefizite bei verschiedenen Mausmodellen für die AK weit vor der Bildung der Amyloidplaques auftreten [115,121,122,123]. Zudem konnten in der Vergangenheit bereits bei drei Monate alten APP23-Mäusen kognitive Defizite beobachtet werden. Die hier vorgestellte Studie zeigt erstmals auf Proteomebene, dass molekulare Veränderungen weit vor den ersten strukturellen Veränderungen zu funktionellen Störungen des Gehirns führen könnten.

4.1.4 Verdünnung des Effektes im Cortex der APP23-Mäuse

Im Cortex konnten im Rahmen dieser Studie keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Plastizität beobachtet werden, wenngleich auch hier viele plastizitätsassoziierte Proteine herunterreguliert waren. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass auch im Cortex die Expression von mutiertem APP (mit Schwedischer Mutation) zu einer Abnahme in der Anzahl dendritischer Spines von Mäusen führt [124]. Allerdings hing dieser Effekt stark von dem Neuronentyp ab [125]. Weiterhin sind der Zeitpunkt und die Dauer des Prozesses der adoleszenten Gehirnreifung im Neocortex sehr regionsspezifisch. Diese Fakten könnten also begründen warum im Cortex keine allgemeine Abnahme der entwicklungsbedingten Proteomreorganisation beobachtet werden konnte. Der Effekt könnte sich sozusagen „verdünnt“ haben. Analog dazu konnte in der Vergangenheit im Cortex von APP23-Mäusen auch keine Reduktion der Spineanzahl gefunden werden, als Spines von Neuronen des gesamten Neocortex gezählt wurden [126].

4.1.5 Das Embryonalstadium ET16: frühe Herunterregulation von Proteasomproteinen

Neben den neuronenspezifischen Proteinen waren auch viele weitere Proteine in den APP23-Mäusen aller Altersstufen quantitativ verändert. Diese Proteine wurden in acht funktionelle Gruppen eingeteilt. Dabei fiel auf, dass die Verteilung der funktionellen Gruppen an ET16 von der Verteilung der adulten Altersstadien abwich. Diese Abweichung konnte jedoch anhand der Daten, die bei der Untersuchung der normalen embryonalen Gehirnentwicklung gewonnen worden waren, erklärt werden. Auch bei den hier identifizierten Proteinen war die Kategorie „Transkription, Translation, und Nukleotid-Metabolismus“ die funktionelle Gruppe mit den meisten Mitgliedern. Die abweichende Verteilung könnte daher zeigen, dass viele der Proteine, die auch während der normalen Gehirnentwicklung quantitativ reguliert werden, durch die Expression des mutierten APP vom Wildtyp abweichend reguliert werden.

Die an ET16 zweitgrößte funktionelle Gruppe veränderter Proteine war die Gruppe „Abbau“. Interessanterweise war diese Gruppe bei den im Rahmen der normalen Embryonalentwicklung veränderten Proteinen prozentual nicht so stark vertreten. Dies gilt auch für die adulten Altersstadien der APP23-Mäuse.

Die Gruppe bestand größtenteils aus Mitgliedern des 26S-Proteasom-Komplexes. Alle Proteasomproteine waren herunterreguliert. Eine Herunterregulation von Proteasomproteinen wurde auch im Hippocampus und Cortex von ein, zwei und sieben Monate alten APP23-Mäusen gefunden. Nur in fünfzehn Monate alten Mäusen waren keine Proteasomproteine verändert. Vor kurzem wurden ähnliche Resultate publiziert [127]. Eine Herunterregulation von Proteasomproteinen in einem so frühen Stadium wie ET16 wurde bisher jedoch noch nie demonstriert.

Interessanterweise spielt das 26S-Proteasom eine essentielle Rolle für die neuronale Plastizität und die Neurogenese. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) baut Proteine ab und reguliert auf diese Weise deren Umsatz während der Axogenese sowie der Bildung und dem Abbau von Synapsen [128,129]. Im Rahmen der

AK ist bekannt, dass A β die Proteasomaktivität direkt inhibiert [127,130]. Somit ist anzunehmen, dass auch in den APP23-Mäusen das Proteasom durch die Überproduktion von A β inhibiert wurde. Dies hätte eine besonders dramatische Auswirkung auf die höchstplastischen Altersphasen (postnatale Phase und Adoleszenz) sowie die embryonale Neurogenese.

4.1.6 In mehreren Stadien veränderte Proteine: potentielle APP-Interaktionspartner

Bei der Auflistung der signifikant veränderten Proteine fiel auf, dass die meisten Proteinveränderungen auf jeweils eines der Altersstadien und/oder eine der Gehirnregionen beschränkt waren. Nur dreizehn Proteine waren in fünf oder mehr Stadien der APP23-Mäuse (im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen) hinsichtlich ihrer Abundanz verändert. Diese Proteine könnten daher potentielle Interaktionspartner von APP darstellen und werden im Folgenden diskutiert.

Aus der Gruppe „Signaltransduktion“ war das *Guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit* (G-Protein, Genname *Gnb1*) in mehr als fünf Stadien verändert. Es war im Hippocampus von APP23-Mäusen aller untersuchten Altersstadien sowie im Cortex von sieben und fünfzehn Monate alten APP23-Mäusen herunterreguliert.

Heterotrimeren G-Proteine, die sich aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit zusammensetzen, haben eine Schlüsselrolle in der zellulären Signaltransduktion. Die Tatsache, dass die β -Untereinheit des G-Proteins in sechs Stadien verändert war, könnte damit in Verbindung stehen, dass APP ein G-Protein-gekoppelter Zelloberflächenrezeptor ist. Interessanterweise wurde ein Expressionsunterschied von *Gnb1* auch bereits in Gehirnproben humaner AK-Patienten nachgewiesen [80].

In adulten APP23-Mäusen bestand die größte funktionelle Gruppe an veränderten Proteinen aus mit dem Metabolismus assoziierten Proteinen. Veränderungen von Proteinen des Kohlenhydrat- und Energiemetabolismus sind bereits in menschlichen Alzheimerpatienten bekannt und werden zu den frühen alzheimerrelevanten Veränderungen gezählt [131,132]. Analog dazu waren vier Proteine (Gennamen *Eno2*, *Ldhb*, *Pgk1* und *Tpi1*), die eine wichtige Rolle in der Glykolyse spielen, sowie zwei Proteine (Gennamen *Atp5b* und *Atp5h*), die eine wichtige Rolle in der Oxidativen Phosphorylierung spielen, in mehr als fünf Stadien verändert. Da insgesamt nur dreizehn Proteine in mehr als fünf Stadien verändert waren, spiegelt sich auch in dieser Teilgruppe der varianten Proteine wieder, dass die meisten veränderten Proteine mit dem Metabolismus assoziiert sind. Erwähnenswert ist, dass die Glykolyse auch lokal an Synapsen stattfindet [133]. Kürzlich wurde zudem bekannt, dass APP auch in die mitochondriale Membran integriert wird. Eine erhöhte Konzentration an mitochondrialem APP stört den dortigen Energiemetabolismus und generiert oxidativen Stress [134].

Eine Metabolismus-Untergruppe ist der Lipid-Metabolismus. Aus dieser Gruppe war ein Protein, das *Apolipoprotein E* (Apo-E, Genname *ApoE*), in mehr als fünf Stadien verändert. Seine Expression war sowohl in

jungen als auch in alten APP23-Mäusen hochreguliert. Die Hochregulation der Expression von Apo-E wurde bereits mehrfach in Mausmodellen für die AK (unter anderem auch in APP23-Mäusen) gezeigt [135,136]. Auch in embryonalen Stammzellen, die humanes APP überexprimieren, ist Apo-E hochreguliert [137]. Die vermehrte Produktion von Apo-E stellt also eine direkte Reaktion auf eine Überexpression von humanem APP dar.

Apo-E wird im Gehirn hauptsächlich von Astrozyten produziert und liefert als Transportprotein Cholesterin und andere Lipide an neuronale Lipoproteinrezeptoren [138]. Daneben bindet Apo-E mit hoher Affinität auch an A β und bewirkt dessen Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke [139]. Diese Tatsache könnte mit dem erhöhten Risiko für die Ausbildung der AK bei Menschen, die das Apo-E4-Allel tragen, in Verbindung stehen, da Apo-E4 zum Einen die Bildung von fibrillärem A β begünstigt und zum Anderen aufgrund seiner geringeren Affinität zu A β dessen Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke vermindert [140,141]. Die genauen Ursachen für die Erhöhung des AK-Risikos durch die Expression von Apo-E4 bleiben jedoch noch zu klären.

Grundsätzlich besteht aufgrund der Bindung von Apo-E an A β eine Verbindung zwischen APP und der Cholesterinhomöostase [142]. Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil von Membranen und ist vor allem in Myelinscheiden hoch angereichert. Damit ist Cholesterin essentiell für die Myelinisierung von Neuronen, die in plastischen Gehirnregionen bis weit in das Alter hinein erfolgt. Die Myelinschichten dieser spät myelinisierten Neurone sind jedoch dünner und daher anfälliger gegenüber einer Demyelinisierung, die im Absterben der demyelinisierten Neuronen resultiert. Sterben Neurone der Assoziationszentren ab, so würde eine Diskonnektion von Funktionen, die auf ein hochsynchronisiertes Timing von Impulsen angewiesen sind, erfolgen. Dieser Verlust an Synchronität würde nach und nach einen zerstörerischen Effekt auf immer mehr neuronale Netzwerke ausüben. Interessanterweise lässt sich dieses Szenario, das möglicherweise auf einer Störung der Cholesterinhomöostase durch ein Prozessierungsungleichgewicht von APP beruht, tatsächlich bei AK-Patienten beobachten [7,143].

Ein weiterer Beleg für den Einfluss von APP auf die Cholesterinhomöostase ist die Tatsache, dass Lipoproteinrezeptoren direkt und indirekt mit APP interagieren. Diese Interaktion könnten auch eine wichtige Bedeutung für die Migration von neu gebildeten Neuronen und Axonen, sowie die Ausbildung und die Funktionsweise von Synapsen haben, da Lipoproteinrezeptoren in diese Prozesse involviert sind. Ob die Interaktionen von APP und bestimmten Lipoproteinrezeptoren einen kompetitiven oder kooperativen Charakter besitzen ist jedoch bislang unklar [29].

Die Tatsache, dass die Expression von Apo-E in vielen Altersstadien der APP23-Mäuse verändert war hängt also damit zusammen, dass Apo-E ein direkter Interaktionspartner von APP ist. Zudem scheint APP über diese Interaktion auch einen wichtigen Einfluss auf die Neurogenese sowie die neuronale Plastizität und Stabilität auszuüben.

Ein weiteres, in fünf Stadien verändertes Protein ist das *Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 protein* (Pin1, Genname *Pin1*). Seine Expression war auch zwischen den Altersstadien der Mäuse verändert.

Vor kurzem wurde bekannt, dass das Ausschalten der Pin1-Expression in Mäusen sowohl die Bildung von Amyloidplaques als auch von NFT auslöst. Dieser Effekt ist zudem stark altersabhängig [144]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression oder die Aktivität von Pin1 im Gehirn von Alzheimerpatienten verändert ist [145,146,147,148].

Pin1 katalysiert spezifisch die Änderung der Konformation von Proteinen, die ein Phosphoserin-Prolin- oder Phosphothreonin-Prolin-Motiv tragen. APP besitzt ein Phosphothreonin-Prolin-Motiv und wird durch Pin1 von der *cis*- in die *trans*- Konformation versetzt. Pin1 ist zudem in der Plasmamembran und in sekretorischen Vesikeln, nicht aber in Endosomen mit APP kolokalisiert. Man nimmt daher an, dass Pin1 die intrazelluläre Lokalisation von APP und somit auch dessen Prozessierungsgleichgewicht beeinflusst [144,149]. Interessanterweise besitzt auch Tau ein Bindungsmotiv für Pin1. Die hier gefundene altersbedingte Veränderung der Pin1-Expression könnte den Befund, dass Pin1 die APP-Prozessierung in Abhängigkeit vom Alter verändert, erklären [149].

Die in mehreren Stadien veränderten Proteine Pin1, Apo-E und das G-Protein (*Gnb1*) sind also direkte Interaktionspartner von APP. Dies erklärt warum die Expression dieser Proteine in mehreren Altersstadien verändert war.

4.1.7 Relevanz der Resultate für die Alzheimer-Krankheit des Menschen

Um die Relevanz der am APP23-Mausmodell gewonnenen Daten für die humane AK zu untersuchen, wurde ein Vergleich mit Daten aus drei Proteomstudien, denen Gehirngewebeproben von humanen Alzheimerpatienten zugrunde lagen, angestellt [78,79,80]. Dabei ergab sich, dass 73% der in diesen Studien als in Alzheimerpatienten verändert identifizierten Proteine auch in den APP23-Mäusen verändert waren. Allerdings waren in allen drei Proteomstudien insgesamt nur dreissig variante Proteine identifiziert worden. Dies liegt sicherlich an der Tatsache, dass signifikante Veränderungen bei genetisch identischen Mäusen einfacher zu finden sind als bei Menschen, deren genetischer Background sich von Individuum zu Individuum sehr stark unterscheidet. Dass von den wenigen bei Alzheimerpatienten gefundenen Proteinveränderungen die Mehrzahl auch in den APP23-Mäusen verändert war, spricht für eine hohe Relevanz der an den APP23-Mäusen gewonnenen Daten für die humane AK. Zudem waren in den APP23-Mäusen auch viele weitere Proteine, wie beispielsweise Apo-E oder Pin1 verändert, die in der Vergangenheit bereits mit der AK bei Menschen in Verbindung gebracht worden waren.

4.2 Proteomveränderungen im Verlauf der embryonalen Neurogenese

Die Untersuchung des APP23-Mausmodells für die AK hatte ergeben, dass bereits lange vor dem Auftreten von Plaques schwerwiegende Veränderungen des Gehirnproteoms auftreten. Besonders während der Jugendphase wurden große Unterschiede im Gehirnproteom zwischen APP23- und Wildtypmäusen beobachtet, die mit einer Beeinträchtigung der adoleszenten Gehirnplastizität in Verbindung stehen könnten. Die Plastizität des Gehirns wird vor allem durch die Modifikation sowie den Auf- und Abbau von Synapsen bestimmt. Daneben können aber

auch ganze Neurone neu gebildet werden oder absterben. Interessanterweise ist APP auch in die Neurogenese involviert. Die embryonale Neurogenese beginnt bei *Mus musculus* je nach Gehirnregion zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 *p.c.*. Dementsprechend wird auch APP in diesem Zeitraum das erste Mal von Neuronen exprimiert.

Da die Neurogenese auf Proteomebene bisher nur unzureichend untersucht wurde, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die embryonale Neurogenese von C57BL/6-Mäusen, dem Inzuchtstamm der auch den APP23-Mäusen zugrunde liegt, analysiert. Es wurden Proteinmuster des Gehirns von 9,5; 11,5 und 13,5 Tage (*p.c.*) alten Mausembryonen untersucht. Die ersten beiden Stadien umfassen den Übergang von der mitogenen in die neurogene Phase der Gehirnentwicklung und das dritte Stadium, Tag 13,5 *p.c.*, stellt den Höhepunkt der neurogenen Phase dar. Die Untersuchung soll die Basis für eine zukünftige Studie der Neurogenese bei APP23-Mäusen darstellen.

4.2.1 Proteomveränderungen als begrenzender Faktor für die Geschwindigkeit der Entwicklung

Der Vergleich von Proteinmustern des Gehirns 9,5; 11,5 und 13,5 Tage alter Mausembryonen ergab, dass nach jeweils zwei Tagen der Entwicklung, ähnlich viele (15% und 19%) der untersuchten Proteinspots signifikant verändert waren. *Beckers* und *Irmeler et al.* hatten in Kooperation Gehirne von Embryonen derselben Entwicklungsstadien hinsichtlich ihres Transkriptom untersucht [81,82]. Interessanterweise ergab auch die Transkriptomanalyse dass im untersuchten Zeitraum nach jeweils zwei Tagen der Entwicklung, ähnlich viele (10% und 12%) der untersuchten Transkripte verändert waren. Neben der Gesamtheit an quantitativ veränderten Proteinspots und Transkripten war auch die Menge an hoch- und herunterregulierten Genprodukten immer annähernd gleich.

Die im Verlauf der zellulären Differenzierung benötigte hohe Rate an quantitativen Veränderungen der Proteinexpression wird von einem hohen Bedarf an zellulären Ressourcen wie Energie, Vorläufermolekülen, freiem Raum und ungebundenem Wasser begleitet. Diese Ressourcen stehen jedoch nicht unbegrenzt zur Verfügung. Beispielsweise ist der freie Raum innerhalb einer Zelle ein wichtiger begrenzender Faktor für die Synthese zusätzlicher Proteine. Typische Eukaryontenzellen bestehen zu 18% aus Proteinen und zu 11% aus verschiedenen Molekülen wie Phospholipiden oder Polysacchariden sowie anorganischen Ionen. Circa 1,35% der Zellen sind DNA und RNA-Moleküle. Der Grossteil (70%) des Gesamtgewichtes einer Zelle ist Wasser [150]. Abgesehen von dieser Gewichtsverteilung ist zu beachten, dass die Makromoleküle im Zellinneren dicht gedrängt vorliegen [151]. Dabei bildet das Zytoskelett ein Gittergerüst in dessen Poren sich von Wasser umlagerte Makromoleküle befinden. Diese dichte Organisation innerhalb der Zellen, das „Macromolecular Crowding“ beeinflusst auch die Faltung der Proteine [152]. Eine Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration (bei konstantem Zellvolumen) hat Änderungen der Proteinkonformation zur Folge, was in der Aggregation und dem Funktionsverlust der Proteine resultiert [151]. Das Beispiel des „Macromolecular Crowding“ verdeutlicht die Begrenzung des für die Proteinexpression freien Raumes in der Zelle.

Die theoretischen Überlegungen führen zu dem Schluß, dass die jeweils innerhalb von zwei Entwicklungstagen konstante Anzahl an Veränderungen der Proteinexpression, die im Rahmen der verfügbaren Ressourcen maximale Veränderungsrate darstellt. Weiterhin könnte diese Veränderungsrate ihrerseits ein begrenzender Faktor für die Geschwindigkeit der Embryonalentwicklung sein, denn für die Differenzierung von Zellen ist eine umfassende Umstellung der Zellzusammensetzung notwendig.

Auch die Tatsache, dass während der Embryonalentwicklung die Expression gleich vieler Proteine hoch- wie herunterreguliert war, könnte dadurch erklärt werden, dass im Zuge der Differenzierung zu Neuronen die zusätzliche Synthese bestimmter Proteine erfolgen muß. Die Synthese dieser Proteine muß jedoch durch die Herabsetzung der Konzentration anderer Proteine ausgeglichen werden. Nur auf diese Weise stehen Ressourcen für die zusätzliche Synthese bestimmter Proteine zur Verfügung.

4.2.2 Übereinstimmung der Proteom- und Transkriptomdaten

Genexpressionsstudien eignen sich im Allgemeinen sehr gut um einen Überblick über molekulare Veränderungen zu gewinnen. Neben der Analyse der Genexpression auf Proteomebene werden sehr häufig Transkriptomstudien durchgeführt [153,154,155]. Die Genexpression auf mRNA-Ebene muss aber nicht zwingend mit der Proteinabundanz übereinstimmen, da schon alleine posttranslationale Modifikationen zu einer großen Variabilität der Proteine beitragen [156,157,158]. Studien, in denen das Proteom und das Transkriptom parallel untersucht worden waren, haben in der Vergangenheit gezeigt, dass je nach Untersuchungsobjekt, sehr geringe bis sehr hohe (80%) Übereinstimmungen gefunden werden können [158,159].

In der hier vorgestellten Studie wurde eine relativ hohe Übereinstimmung der Transkriptom- und Proteomdaten von 60 bis 70% gefunden. Dies ist sicherlich auch damit zu begründen, dass in beiden Studien exakt dasselbe Gewebe untersucht wurde. Des Weiteren wurde in beiden Studien auf eine möglichst hohe Anzahl an biologischen Replikaten geachtet.

4.2.3 Zelltypspezifische Modifikation des Proteoms

Ein Vergleich der Anzahl an Proteinspots auf den 2-D-Gelen der drei Stadien Tag 9,5; Tag 11,5 und Tag 13,5 zeigte, dass die Komplexität der Spotmuster in allen Stadien sehr ähnlich war. Dies konnte von der Kooperationsgruppe auf Transkriptomebene bestätigt werden [81].

Eine nahe liegende Erwartung wäre, dass mit der Differenzierung von Zellen viele neue, zelltypspezifische Proteine gebildet werden. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass sich im Zuge der Differenzierung eher die quantitative Relation der untersuchten Proteine zueinander ändert. Die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Neuronen erfolgte also hauptsächlich mit Hilfe von zelltypspezifischen Veränderungen in der relativen Proteinzusammensetzung als mittels der alleinigen Synthese neuer, zuvor nicht exprimierter Proteine.

Um die beobachteten Veränderungen zu charakterisieren, wurde eine funktionelle Kategorisierung der identifizierten Proteine durchgeführt. Dabei fiel auf, dass im Laufe der Entwicklung vor allem mit dem Lipidmetabolismus assoziierte sowie spezifisch neuronale Proteine hochreguliert waren. Fernerhin waren Proteine, die funktionell dem Zytoskelett zugeordnet werden können, im Verlauf der Entwicklung vor allem hochreguliert.

Die beobachteten Tendenzen konnten mittels einer GO-Analyse der Transkriptomdaten bestätigt und verfeinert werden [81]: Innerhalb der im Verlauf der Entwicklung herunterregulierten Transkripte waren die Kategorien „Metabolismus“ und „Zellzyklus“ signifikant angereichert. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass bei Einsetzen der Neurogenese immer mehr Vorläuferzellen von der Proliferation zur Neurogenese übergehen [43].

In etwa ab Tag 11,5 *p.c.* beginnen viele Vorläuferzellen sich asymmetrisch in je ein Neuron und eine Vorläuferzelle zu teilen, bis sie schließlich dazu übergehen, sich symmetrisch in je zwei Neurone zu teilen [41,43]. Analog dazu waren innerhalb der an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 quantitativ hochregulierten Transkripte die GO-Annotationen „Axonformierung“, „Dendritenmorphogenese“, „Synapsenformation“ sowie „Notch- und Wnt-Signalkaskaden“ signifikant angereichert.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie in der das Proteom von *in vitro* kultivierten murinen embryonalen Stammzellen mit dem Proteom dopaminergener Neurone verglichen wurde zeigte interessanterweise ähnliche Resultate bezüglich der funktionellen Kategorisierung veränderter Proteine [160].

4.2.4 Schlüsselproteine für die Neurogenese

Um die molekularen Veränderungen am Übergang von der Proliferations- zur Neurogenesephase genauer zu untersuchen, wurde die Expression einzelner Proteine näher betrachtet. Dabei handelt es sich um Proteine, die bei der Determinierung des Zellschicksals oder im Rahmen der Differenzierung der Zellen eine wichtige Rolle spielen. Veränderungen dieser Schlüsselproteine könnten auch im Rahmen der Untersuchung der Neurogenese bei APP23-Mäusen eine Schlüsselrolle spielen.

4.2.4.1 Das proliferationsstimulierende Protein TCTP

Das *Translationally controlled tumor protein* (TCTP, Genname *Tpt1*) besitzt eine proliferationsstimulierende Funktion. Es induziert die Zellproliferation indem es mit G-Proteinen interagiert [161]. Wird die Expression von TCTP in Mäusen experimentell ausgeschaltet, führt dies zum Absterben der Embryonen an Tag 5,5 *p.c.* [162]. TCTP stellt daher ein, während der mitogenen Phase der Gehirnentwicklung essentielles Protein dar.

Analog dazu war die Expression von TCTP im Laufe der Entwicklung an Tag 13,5; einem Stadium in dem die Neurogenese überwiegt; zu Tag 9,5; einem Stadium in dem die Proliferation der Vorläuferzellen überwiegt; herunterreguliert. Dieses Ergebnis stimmt weiterhin mit einer Studie von Wang *et al.* überein. Hier wurde

gezeigt, dass die Expression von TCTP in dopaminergen Neuronen im Vergleich zu ihren Vorläuferzellen herunterreguliert war [160].

4.2.4.2 Differenzierungsstimulierende Proteine

Die Transkriptionsanalyse der Kooperationsgruppe hatte ergeben, dass Mitglieder des Notch-Signalwegs im Verlauf der Entwicklung verändert waren [163]. Der Notch-Signalweg spielt während der frühen neurogenen Phase der Gehirnentwicklung eine wichtige Rolle [45]. Dies zeigte unter anderem die Untersuchung von Mäusen, denen das *Notch1*-Gen fehlte. In der Embryonalentwicklung dieser Mäuse kam es zu einer verfrühten Initiation der symmetrischen Neurogenese sowie einer Verminderung der Proliferation und Gliogenese der Vorläuferzellen [81]. Die Expression von *Notch1* beginnt im embryonalen Gehirn mit der Initiation der Neurogenese. Es wird angenommen, dass der Notch-Signalweg die asymmetrische Teilung der Vorläuferzellen in jeweils ein Neuron und eine Vorläuferzelle, nicht aber deren symmetrische Teilung in jeweils zwei Neurone stimuliert [164].

Die Aktivität des Notch-Rezeptors innerhalb der Notch-Signalkaskade wird durch die Abspaltung der intrazellulären Domäne NICD initiiert. Entsprechend der hier vorgestellten Immunoblottingergebnisse sowie der Transkriptomanalyse war die NICD an Tag 13,5 im Vergleich zu Tag 11,5 deutlich herunterreguliert. Auf Transkriptebeine war die Expression von *Notch1* von Tag 9,5 zu Tag 11,5 hoch- und von Tag 11,5 zu Tag 13,5 herunterreguliert. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit der Theorie überein, dass der Notch-Signalweg während der frühen Neurogenese die asymmetrische Teilung der Vorläuferzellen stimuliert und während der späten neurogenen Phase inaktiv ist.

Die Transkriptomanalyse der Kooperationsgruppe hatte weiterhin ergeben, dass zwei der Zielgene des Notch-Signalwegs, *Hairy and enhancer of split 1* und 5 (*Hes1* und *Hes5*), eine gegensätzliche Expressionsveränderung zeigten. Während die Expressionsveränderung von *Hes5* der von *Notch1* glich, war die Expression von *Hes1* an Tag 11,5 verglichen mit Tag 9,5 herunterreguliert und an Tag 13,5 verglichen mit Tag 11,5 wieder hochreguliert. Diese gegensätzliche Regulation der beiden Zielgene des Notch-Signalwegs könnte mit der Tatsache in Verbindung stehen, dass die Expression von *Hes1* bereits bei Bildung des Neuroektoderms einsetzt, während *Hes5* erst später, an Tag 8,5 bis 9 *p.c.* exprimiert wird [164,165]. Während die Expression von *Hes5* direkt mit dem Notch-Signalweg korreliert, könnte *Hes1* auch in die von Notch unabhängige Regulation der frühen Gehirnentwicklung involviert sein.

Der kanonische Wnt-Signalweg spielt sowohl während der mitogenen als auch während der späten neurogenen Phase der Gehirnentwicklung eine wichtige Rolle [45]. Der Wnt-Signalweg stimuliert die Expression des *Neuron restrictive silencer factor/repressor element 1 Transkription factor* (Genname *Rest*) [166]. *Rest* war auf Transkriptebeine an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 herunter- und an Tag 13,5 im Vergleich zu Tag 11,5 hochreguliert. Dieses Expressionsmuster entspricht der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs während der mitogenen (Tag 9,5) und während der späten neurogenen Phase der Gehirnentwicklung (Tag 13,5).

Die zur Gruppe der bHLH zählenden, die Neurogenese stimulierenden Proteine *Neurogenin1* und 2 (Gennamen *Neurog1* und 2) interagieren mit beiden Signalwegen, dem Notch- und dem Wnt-Signalweg [45,47,50]. Während die Expression der *Neurogenin2*-Transkripte an Tag 13,5; der Hochphase der Neurogenese im Vergleich zu Tag 11,5 hochreguliert war, war *Neurogenin1* an Tag 13,5 im Vergleich zu den beiden anderen Stadien herunterreguliert. Dieses Ergebnis deutet auf eine unterschiedliche Funktionsweise der beiden neurogenesestimulierenden Proteine hin.

Auf Proteomebene war die Expression des *C-terminal binding protein 1* (Genname *CtBP1*) an Tag 11,5 im Vergleich zu Tag 9,5 hochreguliert. Dies entspricht der Tatsache, dass das *CtBP1* vielfältige Funktionen während der Zelldifferenzierung besitzt [167].

4.2.4.3 Zytoskelettproteine

Ein Hauptmerkmal der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neuronen ist die Zellmorphologie. Das Erscheinungsbild von Zellen wird hauptsächlich durch das Zytoskelett bestimmt. Analog dazu waren viele mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine im Verlauf der embryonalen Gehirnentwicklung von Tag 9,5 zu Tag 13,5 hochreguliert.

Die neuronale Morphogenese erfolgt hauptsächlich durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts [168,169]. Neu generierte Neurone bilden zunächst aktinreiche Neuriten aus, die dann als Wachstumskegel weiter auswachsen. Die Mobilität des Wachstumskegels wird hauptsächlich mittels eines hohen Aktin-Umsatzes ermöglicht. Diese Dynamiken werden von einer Reihe Aktin-bindender Proteine reguliert. Dabei sind sowohl die Aktivität als auch die Konzentration der Aktin-bindenden Proteine von hoher Bedeutung [168,170].

Ein Aktin-bindendes Protein ist das *Actin-related protein 2/3 complex subunit 5* (Genname *Arpc5*). Es initiiert die Bildung von filamentösem Aktin an Verzweigungspunkten bereits existierender Aktin-Filamente. Seine Expression war im Laufe der Entwicklung signifikant hochreguliert.

Auch die Expression weiterer Proteine, die das Aktin-Zytoskelett reorganisieren, war im Laufe der Entwicklung hochreguliert. Als Beispiele seien die Proteine *Neuromodulin* (Genname *Gap43*), *Myristoylated alanine-rich C kinase substrate* (Genname *Marcks*) und *Brain acid soluble protein 1* (Genname *Basp1*) erwähnt, deren Funktionsweise sehr ähnlich ist [169]. *Neuromodulin* spielt eine besonders wichtige Rolle bei der Entwicklung von Neuronen. Es wird spezifisch im Wachstumskegel differenzierender Neurone exprimiert und dient daher in vielen Studien als Markerprotein für die Neurogenese [87,88]. Dass sowohl die Konzentration der *Neuromodulin*-Transkripte als auch der -Proteinspots von Tag 9,5 zu Tag 13,5 signifikant anstieg, passt zu der Tatsache, dass in dieser Phase der Entwicklung die Neurogenese initiiert wird.

Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts wird durch eine Reihe von Signalkaskaden gesteuert. Hauptakteure im Zuge der Neurogenese sind hierbei GTP-bindende Proteine der Rho-Familie (*Ras homolog gene family*) [171]. Diese Signalmoleküle koppeln die Aktivität von Zelloberflächenrezeptoren an die Regulation des

Zytoskeletts. Zwei Mitglieder der Rho-Familie sind das *Ras homolog gene family, member A protein* (Genname *RhoA*) sowie das *Cell division cycle 42 homolog* (Genname *Cdc42*). Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression beider Proteine/Transkripte erwartungsgemäß im Verlauf der Entwicklung hochreguliert war. Die Expression eines dritten Mitglieds der Rho-Familie, des *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Genname *Ras1*) war jedoch nicht signifikant verändert.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Proteomstudien in der medizinischen Forschung dienen im Allgemeinen dem Screening nach potentiellen krankheitsrelevanten Proteinexpressionsveränderungen. Aussagen über die Funktionen der veränderten Proteine und ihre Rolle im Krankheitsprozess können nur zusätzliche umfangreiche Studien liefern. Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine Proteomstudie auch Hinweise auf grundlegende Mechanismen in der Entwicklung einer Krankheit oder der Embryonalentwicklung liefern kann.

Eine grundlegende Untersuchung der Proteomveränderung im Verlauf der embryonalen Gehirnentwicklung umfasste den Übergang von der mitogenen zur neurogenen Phase der Entwicklung. Die Studie hat zusammengenommen ergeben, dass innerhalb eines Zeitraums von zwei Tagen immer nahezu gleich viele Proteine quantitativ verändert waren. Da im Zuge der Zelldifferenzierung ein sehr großer Bedarf an molekularen Veränderungen besteht, ist anzunehmen, dass die gefundene Anzahl an Veränderungen die maximal mögliche Veränderungsrate innerhalb des Zeitraums von zwei Tagen widerspiegelt. Diese maximal mögliche Veränderungsrate könnte ein begrenzender Faktor für die Geschwindigkeit der Embryonalentwicklung sein. Weiterhin ergab die Proteomuntersuchung, dass im Rahmen der Zelldifferenzierung die Konzentration zelltypspezifischer Proteine anstieg während im Gegenzug andere, unspezifische Proteine herunterreguliert waren. Es erfolgte also eher eine quantitative Regulation der vorhandenen Proteine als eine Neubildung zusätzlicher Proteine. Auf Basis bereits bekannter Daten konnten zudem Aussagen über verschiedene wichtige Proteine getätigt werden. So waren beispielsweise im Zuge der Neurogenese viele Zytoskelettbestandteile hochreguliert. Mit Hilfe der Immunoblottingtechnik konnte die Theorie bestätigt werden, dass die Notch-Signalkaskade ein wichtiger Stimulator der asymmetrischen Teilung von Vorläuferzellen in je ein Neuron und eine Vorläuferzelle ist. Interessanterweise stimmten alle gewonnenen Erkenntnisse mit der Transkriptomstudie einer Kooperationsgruppe überein und konnten von ihr ergänzt werden.

Zukünftig soll die hier untersuchte Entwicklungsphase des Gehirns auch am APP23-Mausmodell für die AK untersucht werden um die Auswirkungen von APP auf die Neurogenese besser zu verstehen. Die Untersuchung der normalen Embryonalentwicklung kann hierfür die Grundlage bilden.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand jedoch die Untersuchung des APP23-Mausmodells für die AK. Mit Methoden der Proteomanalyse wurden, beginnend mit einem Embryonalstadium, verschiedene adulte Stadien untersucht und somit eine Art „Lebensprofil“ des Proteoms von APP23-Mäusen erstellt. Die gewonnenen Daten zeigen erstmals auf Proteomebene, dass dem Ausbruch der AK eine lange klinisch stille Phase vorausgeht. Der

Hauptfaktor in der Pathogenese der AK, die Degeneration von Synapsen ist ein langsamer Prozess, der durch Fehler in lokalen Regulationsmechanismen der neuronalen Plastizität ausgelöst wird [12]. Im Rahmen dieser Studie konnten in allen untersuchten Altersstadien und Gehirnregionen viele Unterschiede in der Proteomzusammensetzung der APP23- und der Wildtypmäuse festgestellt werden. Jedoch bestand im Hippocampus adoleszenter, zwei Monate alter Mäuse, ein besonders großer Unterschied. In dieser Entwicklungsphase besteht normalerweise eine besonders hohe neuronale Plastizität. Im Hippocampus der APP23-Mäuse waren jedoch viele entwicklungsbedingte Proteomveränderungen ausgeblieben. Zusammen mit der Beobachtung, dass viele synaptische Proteine im Hippocampus der APP23-Mäuse herunterreguliert waren, weist dies darauf hin, dass während der Adoleszenz ein natürlicher Peak in der hippocampalen Plastizität der APP23-Mäuse ausgeblieben war.

Diese Erkenntnisse könnten von großer Bedeutung für das Verständnis krankheitsverursachender Mechanismen sein. Die Studie zeigt am Beispiel der Alzheimer-Krankheit, dass es von großer Wichtigkeit ist, bereits sehr frühe Altersstadien zu untersuchen, um die primären Mechanismen, die später zur Erkrankung führen, verstehen und diagnostizieren zu können. Weiterhin wurde deutlich, dass eine Proteomstudie nicht nur Hinweise auf potentielle krankheitsauslösende Proteine liefern kann, sondern auch den zeitlichen Verlauf der Erkrankung und die betroffenen Gewebe aufzeigt.

In Zukunft soll auch die embryonale Neurogenese der APP23-Mäuse untersucht werden. Des Weiteren sollen Lebensprofile zusätzlicher Mausmodelle für die AK erstellt und die Daten mit denen anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie der Parkinson- oder der Huntington-Krankheit verglichen werden. So können nach und nach auf Proteomebene allgemeine sowie spezifische krankheitsauslösende Mechanismen aufgedeckt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Weyerer, S. (2005): Altersdemenz., Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut, Berlin, Heft 28, November 2005
- [2] Dilling H, Mombour W, Schmidt MH (1993): Internationale Klassifikation psychischer Störungen., MH, Schmidt, Ed, Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle.
- [3] Goedert, M. and Spillantini, M. G. (2006): A century of Alzheimer's disease, *Science* (vol. 314), No. 5800, pp. 777-81.
- [4] Allsop, D.; Landon, M. and Kidd, M. (1983): The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein, *Brain Res* (vol. 259), No. 2, pp. 348-52.
- [5] Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature* (vol. 325), No. 6106, pp. 733-6.
- [6] Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Quinlan, M.; Tung, Y. C.; Zaidi, M. S. and Wisniewski, H. M. (1986): Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments, *J Biol Chem* (vol. 261), No. 13, pp. 6084-9.
- [7] Arendt, T. (2003): Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity, *Prog Neurobiol* (vol. 71), No. 2-3, pp. 83-248.
- [8] Braak, H.; Braak, E. and Bohl, J. (1993): Staging of Alzheimer-related cortical destruction, *Eur Neurol* (vol. 33), No. 6, pp. 403-8.
- [9] Mocerri, V. M.; Kukull, W. A.; Emanuel, I.; van Belle, G. and Larson, E. B. (2000): Early-life risk factors and the development of Alzheimer's disease, *Neurology* (vol. 54), No. 2, pp. 415-20.
- [10] Giannakopoulos, P.; Hof, P. R.; Surini, M.; Michel, J. P. and Bouras, C. (1993): Quantitative immunohistochemical analysis of the distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of nonagenarians and centenarians, *Acta Neuropathol* (vol. 85), No. 6, pp. 602-10.
- [11] Terry, R. D.; Masliah, E.; Salmon, D. P.; Butters, N.; DeTeresa, R.; Hill, R.; Hansen, L. A. and Katzman, R. (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Ann Neurol* (vol. 30), No. 4, pp. 572-80.
- [12] Selkoe, D. J. (2002): Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science* (vol. 298), No. 5594, pp. 789-91.
- [13] Hernandez, F. and Avila, J. (2007): Tauopathies, *Cell Mol Life Sci* (vol. 64), No. 17, pp. 2219-33.
- [14] Hardy, J. and Allsop, D. (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol Sci* (vol. 12), No. 10, pp. 383-8.
- [15] Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* (vol. 297), No. 5580, pp. 353-6.
- [16] Rovelet-Lecrux, A.; Hannequin, D.; Raux, G.; Le Meur, N.; Laquerriere, A.; Vital, A.; Dumanchin, C.; Feuillette, S.; Brice, A.; Vercelletto, M.; Dubas, F.; Frebourg, T. and Campion, D. (2006): APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy, *Nat Genet* (vol. 38), No. 1, pp. 24-6.

- [17] Lott, I. T. and Head, E. (2001): Down syndrome and Alzheimer's disease: a link between development and aging, *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* (vol. 7), No. 3, pp. 172-8.
- [18] Blennow, K.; de Leon, M. J. and Zetterberg, H. (2006): Alzheimer's disease, *Lancet* (vol. 368), No. 9533, pp. 387-403.
- [19] Bu, G.; Cam, J. and Zerbinatti, C. (2006): LRP in amyloid-beta production and metabolism, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 1086), pp. 35-53.
- [20] Walsh, D. M.; Minogue, A. M.; Sala Frigerio, C.; Fadeeva, J. V.; Wasco, W. and Selkoe, D. J. (2007): The APP family of proteins: similarities and differences, *Biochem Soc Trans* (vol. 35), No. Pt 2, pp. 416-20.
- [21] Anliker, B. and Muller, U. (2006): The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins, *Neurodegener Dis* (vol. 3), No. 4-5, pp. 239-46.
- [22] Turner, P. R.; O'Connor, K.; Tate, W. P. and Abraham, W. C. (2003): Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory, *Prog Neurobiol* (vol. 70), No. 1, pp. 1-32.
- [23] Tanaka, S.; Shiojiri, S.; Takahashi, Y.; Kitaguchi, N.; Ito, H.; Kameyama, M.; Kimura, J.; Nakamura, S. and Ueda, K. (1989): Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 165), No. 3, pp. 1406-14.
- [24] Coulson, E. J.; Paliga, K.; Beyreuther, K. and Masters, C. L. (2000): What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function, *Neurochem Int* (vol. 36), No. 3, pp. 175-84.
- [25] Gralle, M. and Ferreira, S. T. (2007): Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts, *Prog Neurobiol* (vol. 82), No. 1, pp. 11-32.
- [26] Reinhard, C.; Hebert, S. S. and De Strooper, B. (2005): The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function, *Embo J* (vol. 24), No. 23, pp. 3996-4006.
- [27] Kins, S.; Lauther, N.; Szodorai, A. and Beyreuther, K. (2006): Subcellular trafficking of the amyloid precursor protein gene family and its pathogenic role in Alzheimer's disease, *Neurodegener Dis* (vol. 3), No. 4-5, pp. 218-26.
- [28] Soba, P.; Eggert, S.; Wagner, K.; Zentgraf, H.; Siehl, K.; Kreger, S.; Lower, A.; Langer, A.; Merdes, G.; Paro, R.; Masters, C. L.; Muller, U.; Kins, S. and Beyreuther, K. (2005): Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion, *Embo J* (vol. 24), No. 20, pp. 3624-34.
- [29] Hoe, H. S. and William Rebeck, G. (2008): Functional Interactions of APP with the ApoE Receptor Family, *J Neurochem*.
- [30] Stolt, P. C. and Bock, H. H. (2006): Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins, *Cell Signal* (vol. 18), No. 10, pp. 1560-71.
- [31] McLoughlin, D. M. and Miller, C. C. (2008): The FE65 proteins and Alzheimer's disease, *J Neurosci Res* (vol. 86), No. 4, pp. 744-54.
- [32] Koushika, S. P. (2008): "JIP"ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport, *Bioessays* (vol. 30), No. 1, pp. 10-4.
- [33] Mahlapuu, R.; Viht, K.; Balaspiri, L.; Bogdanovic, N.; Saar, K.; Soomets, U.; Land, T.; Zilmer, M.; Karelson, E. and Langel, U. (2003): Amyloid precursor protein carboxy-terminal fragments modulate G-proteins and adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease brain, *Brain Res Mol Brain Res* (vol. 117), No. 1, pp. 73-82.
- [34] Ring, S.; Weyer, S. W.; Kilian, S. B.; Waldron, E.; Pietrzik, C. U.; Filippov, M. A.; Herms, J.; Buchholz, C.; Eckman, C. B.; Korte, M.; Wolfer, D. P. and Muller, U. C. (2007): The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is

- sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice, *J Neurosci* (vol. 27), No. 29, pp. 7817-26.
- [35] Yankner, B. A.; Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. (1990): Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides, *Science* (vol. 250), No. 4978, pp. 279-82.
 - [36] Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S. and Malinow, R. (2003): APP processing and synaptic function, *Neuron* (vol. 37), No. 6, pp. 925-37.
 - [37] Lacor, P. N.; Buniel, M. C.; Chang, L.; Fernandez, S. J.; Gong, Y.; Viola, K. L.; Lambert, M. P.; Velasco, P. T.; Bigio, E. H.; Finch, C. E.; Krafft, G. A. and Klein, W. L. (2004): Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers, *J Neurosci* (vol. 24), No. 45, pp. 10191-200.
 - [38] Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K. L.; Lacor, P. N.; Lambert, M. P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A. and Klein, W. L. (2003): Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 18, pp. 10417-22.
 - [39] Lacor, P. N.; Buniel, M. C.; Furlow, P. W.; Clemente, A. S.; Velasco, P. T.; Wood, M.; Viola, K. L. and Klein, W. L. (2007): Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease, *J Neurosci* (vol. 27), No. 4, pp. 796-807.
 - [40] Bellion, A. and Metin, C. (2005): Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence, *Brain Res Bull* (vol. 66), No. 4-6, pp. 402-9.
 - [41] Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. (2005): Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain, *Neurosci Res* (vol. 51), No. 4, pp. 331-6.
 - [42] Qian, X.; Shen, Q.; Goderie, S. K.; He, W.; Capela, A.; Davis, A. A. and Temple, S. (2000): Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells, *Neuron* (vol. 28), No. 1, pp. 69-80.
 - [43] Gotz, M. and Huttner, W. B. (2005): The cell biology of neurogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 6), No. 10, pp. 777-88.
 - [44] Bentivoglio, M. and Mazzarello, P. (1999): The history of radial glia, *Brain Res Bull* (vol. 49), No. 5, pp. 305-15.
 - [45] Guillemot, F. (2007): Cell fate specification in the mammalian telencephalon, *Prog Neurobiol*.
 - [46] Takahashi, T.; Nowakowski, R. S. and Caviness, V. S., Jr. (1995): The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall, *J Neurosci* (vol. 15), No. 9, pp. 6046-57.
 - [47] Kageyama, R.; Ohtsuka, T.; Hatakeyama, J. and Ohsawa, R. (2005): Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation, *Exp Cell Res* (vol. 306), No. 2, pp. 343-8.
 - [48] Swiatek, P. J.; Lindsell, C. E.; del Amo, F. F.; Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994): Notch1 is essential for postimplantation development in mice, *Genes Dev* (vol. 8), No. 6, pp. 707-19.
 - [49] Chenn, A. and Walsh, C. A. (2003): Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice, *Cereb Cortex* (vol. 13), No. 6, pp. 599-606.
 - [50] Hirabayashi, Y.; Itoh, Y.; Tabata, H.; Nakajima, K.; Akiyama, T.; Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004): The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells, *Development* (vol. 131), No. 12, pp. 2791-801.
 - [51] Johe, K. K.; Hazel, T. G.; Muller, T.; Dugich-Djordjevic, M. M. and McKay, R. D. (1996): Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system, *Genes Dev* (vol. 10), No. 24, pp. 3129-40.

- [52] Michael J. Zigmond, Floyd E. Bloom, Story C. Landis, James L. Roberts, Larry R. Squire (1999): *Fundamental Neuroscience*, Academic Press.
- [53] Zhao, C.; Deng, W. and Gage, F. H. (2008): Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis, *Cell* (vol. 132), No. 4, pp. 645-60.
- [54] Kempermann, G.; Kuhn, H. G. and Gage, F. H. (1997): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment, *Nature* (vol. 386), No. 6624, pp. 493-5.
- [55] Alvarez-Buylla, A. and Lim, D. A. (2004): For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain, *Neuron* (vol. 41), No. 5, pp. 683-6.
- [56] Greenberg, D. A. and Jin, K. (2006): Neurodegeneration and neurogenesis: focus on Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res* (vol. 3), No. 1, pp. 25-8.
- [57] Verret, L.; Jankowsky, J. L.; Xu, G. M.; Borchelt, D. R. and Rampon, C. (2007): Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis, *J Neurosci* (vol. 27), No. 25, pp. 6771-80.
- [58] Chen, Y. and Tang, B. L. (2006): The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 341), No. 1, pp. 1-5.
- [59] Salbaum, J. M. and Ruddle, F. H. (1994): Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons, *J Exp Zool* (vol. 269), No. 2, pp. 116-27.
- [60] Trapp, B. D. and Hauer, P. E. (1994): Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development, *J Neurosci Res* (vol. 37), No. 4, pp. 538-50.
- [61] Games, D.; Adams, D.; Alessandrini, R.; Barbour, R.; Berthelette, P.; Blackwell, C.; Carr, T.; Clemens, J.; Donaldson, T.; Gillespie, F. and et al. (1995): Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein, *Nature* (vol. 373), No. 6514, pp. 523-7.
- [62] Hsiao, K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S.; Yang, F. and Cole, G. (1996): Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice, *Science* (vol. 274), No. 5284, pp. 99-102.
- [63] Duff, K.; Eckman, C.; Zehr, C.; Yu, X.; Prada, C. M.; Perez-tur, J.; Hutton, M.; Buee, L.; Harigaya, Y.; Yager, D.; Morgan, D.; Gordon, M. N.; Holcomb, L.; Refolo, L.; Zenk, B.; Hardy, J. and Younkin, S. (1996): Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1, *Nature* (vol. 383), No. 6602, pp. 710-3.
- [64] McGowan, E.; Eriksen, J. and Hutton, M. (2006): A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice, *Trends Genet* (vol. 22), No. 5, pp. 281-9.
- [65] Sturchler-Pierrat, C.; Abramowski, D.; Duke, M.; Wiederhold, K. H.; Mistl, C.; Rothacher, S.; Ledermann, B.; Burki, K.; Frey, P.; Paganetti, P. A.; Waridel, C.; Calhoun, M. E.; Jucker, M.; Probst, A.; Staufenbiel, M. and Sommer, B. (1997): Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 24, pp. 13287-92.
- [66] Schwab, C.; Hosokawa, M. and McGeer, P. L. (2004): Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease, *Exp Neurol* (vol. 188), No. 1, pp. 52-64.
- [67] Kelly, P. H.; Bondolfi, L.; Hunziker, D.; Schlecht, H. P.; Carver, K.; Maguire, E.; Abramowski, D.; Wiederhold, K. H.; Sturchler-Pierrat, C.; Jucker, M.; Bergmann, R.; Staufenbiel, M. and Sommer, B. (2003): Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice, *Neurobiol Aging* (vol. 24), No. 2, pp. 365-78.
- [68] Van Dam, D.; D'Hooge, R.; Staufenbiel, M.; Van Ginneken, C.; Van Meir, F. and De Deyn, P. P. (2003): Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition, *Eur J Neurosci* (vol. 17), No. 2, pp. 388-96.

- [69] Theiler, Karl (1989): *The House Mouse*, Springer-Verlag New York.
- [70] Zabel, C. and Klose, J. (2007): Protein extraction for 2-D electrophoresis, *Methods Mol Biol* (vol. in press).
- [71] Klose, J. (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik* (vol. 26), No. 3, pp. 231-43.
- [72] Zabel, C. and Klose, J. (2007): High resolution large gel 2-D electrophoresis, *Methods Mol Biol* (vol. in press).
- [73] Nebrich, G.; Herrmann, M.; Sagi, D.; Klose, J. and Giavalisco, P. (2007): High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein spots from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification, *Electrophoresis* (vol. 28), No. 10, pp. 1607-14.
- [74] Alban, A.; David, S. O.; Bjorkesten, L.; Andersson, C.; Sloge, E.; Lewis, S. and Currie, I. (2003): A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard, *Proteomics* (vol. 3), No. 1, pp. 36-44.
- [75] Luhn, S.; Berth, M.; Hecker, M. and Bernhardt, J. (2003): Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images, *Proteomics* (vol. 3), No. 7, pp. 1117-27.
- [76] Zhang, B.; Kirov, S. and Snoddy, J. (2005): WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts, *Nucleic Acids Res* (vol. 33), No. Web Server issue, pp. W741-8.
- [77] Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem* (vol. 112), No. 2, pp. 195-203.
- [78] Butterfield, D. A. and Sultana, R. (2007): Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: insights into the progression of this dementing disorder, *J Alzheimers Dis* (vol. 12), No. 1, pp. 61-72.
- [79] Sultana, R.; Boyd-Kimball, D.; Cai, J.; Pierce, W. M.; Klein, J. B.; Merchant, M. and Butterfield, D. A. (2007): Proteomics analysis of the Alzheimer's disease hippocampal proteome, *J Alzheimers Dis* (vol. 11), No. 2, pp. 153-64.
- [80] Tsuji, T.; Shiozaki, A.; Kohno, R.; Yoshizato, K. and Shimohama, S. (2002): Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Neurochem Res* (vol. 27), No. 10, pp. 1245-53.
- [81] Hartl, D. and Klose, J. (2008): Transcriptome and proteome analysis of early embryonic mouse brain development, *Proteomics* (vol. in press).
- [82] Irmeler, M.; Hartl, D.; Schmidt, T.; Schuchhardt, J.; Lach, C.; Meyer, H. E.; Hrabe de Angelis, M.; Klose, J. and Beckers, J. (2008): An approach to handling and interpretation of ambiguous data in transcriptome and proteome comparisons, *Proteomics*.
- [83] Blakemore, S. J. (2008): The social brain in adolescence, *Nat Rev Neurosci* (vol. 9), No. 4, pp. 267-77.
- [84] Spear, L. P. (2000): The adolescent brain and age-related behavioral manifestations, *Neurosci Biobehav Rev* (vol. 24), No. 4, pp. 417-63.
- [85] Johnston, M. V. (2004): Clinical disorders of brain plasticity, *Brain Dev* (vol. 26), No. 2, pp. 73-80.
- [86] Verbitsky, M.; Yonan, A. L.; Malleret, G.; Kandel, E. R.; Gilliam, T. C. and Pavlidis, P. (2004): Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice, *Learn Mem* (vol. 11), No. 3, pp. 253-60.

- [87] Mosevitsky, M. I. (2005): Nerve ending "signal" proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1, *Int Rev Cytol* (vol. 245), pp. 245-325.
- [88] Benowitz, L. I. and Routtenberg, A. (1997): GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity, *Trends Neurosci* (vol. 20), No. 2, pp. 84-91.
- [89] Masliah, E.; Mallory, M.; Alford, M.; DeTeresa, R.; Hansen, L. A.; McKeel, D. W., Jr. and Morris, J. C. (2001): Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease, *Neurology* (vol. 56), No. 1, pp. 127-9.
- [90] Spiliotis, E. T. and Nelson, W. J. (2006): Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization, *J Cell Sci* (vol. 119), No. Pt 1, pp. 4-10.
- [91] Xie, Y.; Vessey, J. P.; Konecna, A.; Dahm, R.; Macchi, P. and Kiebler, M. A. (2007): The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology, *Curr Biol* (vol. 17), No. 20, pp. 1746-51.
- [92] Tada, T.; Simonetta, A.; Batteredon, M.; Kinoshita, M.; Edbauer, D. and Sheng, M. (2007): Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons, *Curr Biol* (vol. 17), No. 20, pp. 1752-8.
- [93] Charrier, E.; Reibel, S.; Rogemond, V.; Aguera, M.; Thomasset, N. and Honnorat, J. (2003): Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders, *Mol Neurobiol* (vol. 28), No. 1, pp. 51-64.
- [94] Cole, A. R.; Noble, W.; van Aalten, L.; Plattner, F.; Meimaridou, R.; Hogan, D.; Taylor, M.; LaFrancois, J.; Gunn-Moore, F.; Verkhatsky, A.; Oddo, S.; LaFerla, F.; Giese, K. P.; Dineley, K. T.; Duff, K.; Richardson, J. C.; Yan, S. D.; Hanger, D. P.; Allan, S. M. and Sutherland, C. (2007): Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression, *J Neurochem* (vol. 103), No. 3, pp. 1132-44.
- [95] Petratos, S.; Li, Q. X.; George, A. J.; Hou, X.; Kerr, M. L.; Unabia, S. E.; Hatzinisiriou, I.; Maksel, D.; Aguilar, M. I. and Small, D. H. (2008): The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism, *Brain* (vol. 131), No. Pt 1, pp. 90-108.
- [96] Kimura, I.; Konishi, M.; Miyake, A.; Fujimoto, M. and Itoh, N. (2006): Neudesin, a secreted factor, promotes neural cell proliferation and neuronal differentiation in mouse neural precursor cells, *J Neurosci Res* (vol. 83), No. 8, pp. 1415-24.
- [97] Huntwork, S. and Littleton, J. T. (2007): A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth, *Nat Neurosci* (vol. 10), No. 10, pp. 1235-7.
- [98] Carr, C. M. and Munson, M. (2007): Tag team action at the synapse, *EMBO Rep* (vol. 8), No. 9, pp. 834-8.
- [99] Yamada, M.; Saisu, H.; Ishizuka, T.; Takahashi, H. and Abe, T. (1999): Immunohistochemical distribution of the two isoforms of synaphin/complexin involved in neurotransmitter release: localization at the distinct central nervous system regions and synaptic types, *Neuroscience* (vol. 93), No. 1, pp. 7-18.
- [100] Salimi, K.; Glantz, L. A.; Hamer, R. M.; German, T. T.; Gilmore, J. H. and Jarskog, L. F. (2008): Regulation of complexin 1 and complexin 2 in the developing human prefrontal cortex, *Synapse* (vol. 62), No. 4, pp. 273-282.
- [101] Harrison, P. J. and Eastwood, S. L. (1998): Preferential involvement of excitatory neurons in medial temporal lobe in schizophrenia, *Lancet* (vol. 352), No. 9141, pp. 1669-73.
- [102] Wang, Y. and Tang, B. L. (2006): SNAREs in neurons--beyond synaptic vesicle exocytosis (Review), *Mol Membr Biol* (vol. 23), No. 5, pp. 377-84.
- [103] Stenbeck, G. (1998): Soluble NSF-attachment proteins, *Int J Biochem Cell Biol* (vol. 30), No. 5, pp. 573-7.

- [104] Tani, K.; Shibata, M.; Kawase, K.; Kawashima, H.; Hatsuzawa, K.; Nagahama, M. and Tagaya, M. (2003): Mapping of functional domains of gamma-SNAP, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 15, pp. 13531-8.
- [105] Toonen, R. F. and Verhage, M. (2007): Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control, *Trends Neurosci* (vol. 30), No. 11, pp. 564-72.
- [106] Anggono, V.; Smillie, K. J.; Graham, M. E.; Valova, V. A.; Cousin, M. A. and Robinson, P. J. (2006): Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis, *Nat Neurosci* (vol. 9), No. 6, pp. 752-60.
- [107] DiProspero, N. A.; Chen, E. Y.; Charles, V.; Plomann, M.; Kordower, J. H. and Tagle, D. A. (2004): Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements, *J Neurocytol* (vol. 33), No. 5, pp. 517-33.
- [108] Fdez, E. and Hilfiker, S. (2006): Vesicle pools and synapsins: new insights into old enigmas, *Brain Cell Biol* (vol. 35), No. 2-3, pp. 107-15.
- [109] Kim, E. and Sheng, M. (2004): PDZ domain proteins of synapses, *Nat Rev Neurosci* (vol. 5), No. 10, pp. 771-81.
- [110] Siiskonen, H.; Oikari, S.; Korhonen, V. P.; Pitkanen, A.; Voikar, V.; Kettunen, M.; Hakumaki, J.; Wahlfors, T.; Pussinen, R.; Penttonen, M.; Kiehne, K.; Kaasinen, S. K.; Alhonen, L.; Janne, J. and Herzig, K. H. (2007): Diazepam binding inhibitor overexpression in mice causes hydrocephalus, decreases plasticity in excitatory synapses and impairs hippocampus-dependent learning, *Mol Cell Neurosci* (vol. 34), No. 2, pp. 199-208.
- [111] Ferrarese, C.; Appollonio, I.; Frigo, M.; Meregalli, S.; Piolti, R.; Tamma, F. and Frattola, L. (1990): Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia, *Neurology* (vol. 40), No. 4, pp. 632-5.
- [112] Shrestha, B. R.; Vitolo, O. V.; Joshi, P.; Lordkipanidze, T.; Shelanski, M. and Dunaevsky, A. (2006): Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons, *Mol Cell Neurosci* (vol. 33), No. 3, pp. 274-82.
- [113] Calabrese, B.; Shaked, G. M.; Tabarean, I. V.; Braga, J.; Koo, E. H. and Halpain, S. (2007): Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein, *Mol Cell Neurosci* (vol. 35), No. 2, pp. 183-93.
- [114] Alpar, A.; Ueberham, U.; Seeger, G.; Arendt, T. and Gartner, U. (2007): Effects of wild-type and mutant human amyloid precursor protein on cortical afferent network, *Neuroreport* (vol. 18), No. 12, pp. 1247-50.
- [115] Lanz, T. A.; Carter, D. B. and Merchant, K. M. (2003): Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype, *Neurobiol Dis* (vol. 13), No. 3, pp. 246-53.
- [116] Dong, H.; Goico, B.; Martin, M.; Csernansky, C. A.; Bertchume, A. and Csernansky, J. G. (2004): Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress, *Neuroscience* (vol. 127), No. 3, pp. 601-9.
- [117] Lopez-Toledano, M. A. and Shelanski, M. L. (2007): Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind), *J Alzheimers Dis* (vol. 12), No. 3, pp. 229-40.
- [118] Jin, K.; Galvan, V.; Xie, L.; Mao, X. O.; Gorostiza, O. F.; Bredesen, D. E. and Greenberg, D. A. (2004): Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPsw,Ind) mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 101), No. 36, pp. 13363-7.
- [119] Donovan, M. H.; Yazdani, U.; Norris, R. D.; Games, D.; German, D. C. and Eisch, A. J. (2006): Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease, *J Comp Neurol* (vol. 495), No. 1, pp. 70-83.
- [120] Haughey, N. J.; Nath, A.; Chan, S. L.; Borchard, A. C.; Rao, M. S. and Mattson, M. P. (2002): Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural

- progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease, *J Neurochem* (vol. 83), No. 6, pp. 1509-24.
- [121] Hsia, A. Y.; Masliah, E.; McConlogue, L.; Yu, G. Q.; Tatsuno, G.; Hu, K.; Kholodenko, D.; Malenka, R. C.; Nicoll, R. A. and Mucke, L. (1999): Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 6, pp. 3228-33.
 - [122] Mucke, L.; Masliah, E.; Yu, G. Q.; Mallory, M.; Rockenstein, E. M.; Tatsuno, G.; Hu, K.; Kholodenko, D.; Johnson-Wood, K. and McConlogue, L. (2000): High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *J Neurosci* (vol. 20), No. 11, pp. 4050-8.
 - [123] Jacobsen, J. S.; Wu, C. C.; Redwine, J. M.; Comery, T. A.; Arias, R.; Bowlby, M.; Martone, R.; Morrison, J. H.; Pangalos, M. N.; Reinhart, P. H. and Bloom, F. E. (2006): Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 103), No. 13, pp. 5161-6.
 - [124] Alpar, A.; Ueberham, U.; Bruckner, M. K.; Arendt, T. and Gartner, U. (2006): The expression of wild-type human amyloid precursor protein affects the dendritic phenotype of neocortical pyramidal neurons in transgenic mice, *Int J Dev Neurosci* (vol. 24), No. 2-3, pp. 133-40.
 - [125] Capetillo-Zarate, E.; Staufenbiel, M.; Abramowski, D.; Haass, C.; Escher, A.; Stadelmann, C.; Yamaguchi, H.; Wiestler, O. D. and Thal, D. R. (2006): Selective vulnerability of different types of commissural neurons for amyloid beta-protein-induced neurodegeneration in APP23 mice correlates with dendritic tree morphology, *Brain* (vol. 129), No. Pt 11, pp. 2992-3005.
 - [126] Boncristiano, S.; Calhoun, M. E.; Howard, V.; Bondolfi, L.; Kaeser, S. A.; Wiederhold, K. H.; Staufenbiel, M. and Jucker, M. (2005): Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice, *Neurobiol Aging* (vol. 26), No. 5, pp. 607-13.
 - [127] Tseng, B. P.; Green, K. N.; Chan, J. L.; Blurton-Jones, M. and Laferla, F. M. (2007): Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation, *Neurobiol Aging*.
 - [128] Hegde, A. N. and Upadhyay, S. C. (2007): The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system, *Trends Neurosci* (vol. 30), No. 11, pp. 587-95.
 - [129] van Tijn, P.; Hol, E. M.; van Leeuwen, F. W. and Fischer, D. F. (2008): The neuronal ubiquitin-proteasome system: Murine models and their neurological phenotype, *Prog Neurobiol* (vol. 85), No. 2, pp. 176-93.
 - [130] Oh, S.; Hong, H. S.; Hwang, E.; Sim, H. J.; Lee, W.; Shin, S. J. and Mook-Jung, I. (2005): Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells, *Mech Ageing Dev* (vol. 126), No. 12, pp. 1292-9.
 - [131] Hoyer, S. (2000): Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update, *Exp Gerontol* (vol. 35), No. 9-10, pp. 1363-72.
 - [132] Brooks, W. M.; Lynch, P. J.; Ingle, C. C.; Hatton, A.; Emson, P. C.; Faull, R. L. and Starkey, M. P. (2007): Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease, *Brain Res* (vol. 1127), No. 1, pp. 127-35.
 - [133] Burre, J. and Volkandt, W. (2007): The synaptic vesicle proteome, *J Neurochem* (vol. 101), No. 6, pp. 1448-62.
 - [134] Anandatheerthavarada, H. K. and Devi, L. (2007): Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Neuroscientist* (vol. 13), No. 6, pp. 626-38.
 - [135] Kuo, Y. M.; Beach, T. G.; Sue, L. I.; Scott, S.; Layne, K. J.; Kokjohn, T. A.; Kalback, W. M.; Luehrs, D. C.; Vishnivetskaya, T. A.; Abramowski, D.; Sturchler-Pierrat, C.;

- Staufenbiel, M.; Weller, R. O. and Roher, A. E. (2001): The evolution of A beta peptide burden in the APP23 transgenic mice: implications for A beta deposition in Alzheimer disease, *Mol Med* (vol. 7), No. 9, pp. 609-18.
- [136] Wolf, S. A.; Kronenberg, G.; Lehmann, K.; Blankenship, A.; Overall, R.; Staufenbiel, M. and Kempermann, G. (2006): Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease, *Biol Psychiatry* (vol. 60), No. 12, pp. 1314-23.
- [137] Mao, L.; Zabel, C.; Herrmann, M.; Nolden, T.; Mertes, F.; Magnol, L.; Chabert, C.; Hartl, D.; Herault, Y.; Delabar, J. M.; Manke, T.; Himmelbauer, H. and Klose, J. (2007): Proteomic shifts in embryonic stem cells with gene dose modifications suggest the presence of balancer proteins in protein regulatory networks, *PLoS ONE* (vol. 2), No. 11, p. e1218.
- [138] Herz, J. and Chen, Y. (2006): Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity, *Nat Rev Neurosci* (vol. 7), No. 11, pp. 850-9.
- [139] Shibata, M.; Yamada, S.; Kumar, S. R.; Calero, M.; Bading, J.; Frangione, B.; Holtzman, D. M.; Miller, C. A.; Strickland, D. K.; Ghiso, J. and Zlokovic, B. V. (2000): Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier, *J Clin Invest* (vol. 106), No. 12, pp. 1489-99.
- [140] Holtzman, D. M.; Bales, K. R.; Tenkova, T.; Fagan, A. M.; Parsadanian, M.; Sartorius, L. J.; Mackey, B.; Olney, J.; McKeel, D.; Wozniak, D. and Paul, S. M. (2000): Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 6, pp. 2892-7.
- [141] LaDu, M. J.; Falduto, M. T.; Manelli, A. M.; Reardon, C. A.; Getz, G. S. and Frail, D. E. (1994): Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid, *J Biol Chem* (vol. 269), No. 38, pp. 23403-6.
- [142] Liu, Q.; Zerbinatti, C. V.; Zhang, J.; Hoe, H. S.; Wang, B.; Cole, S. L.; Herz, J.; Muglia, L. and Bu, G. (2007): Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1, *Neuron* (vol. 56), No. 1, pp. 66-78.
- [143] Bartzokis, G. (2004): Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* (vol. 25), No. 1, pp. 5-18; author reply 49-62.
- [144] Balastik, M.; Lim, J.; Pastorino, L. and Lu, K. P. (2007): Pin1 in Alzheimer's disease: multiple substrates, one regulatory mechanism?, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1772), No. 4, pp. 422-9.
- [145] Wang, S.; Simon, B. P.; Bennett, D. A.; Schneider, J. A.; Malter, J. S. and Wang, D. S. (2007): The significance of Pin1 in the development of Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis* (vol. 11), No. 1, pp. 13-23.
- [146] Sultana, R.; Boyd-Kimball, D.; Poon, H. F.; Cai, J.; Pierce, W. M.; Klein, J. B.; Markesbery, W. R.; Zhou, X. Z.; Lu, K. P. and Butterfield, D. A. (2006): Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis, *Neurobiol Aging* (vol. 27), No. 7, pp. 918-25.
- [147] Liou, Y. C.; Sun, A.; Ryo, A.; Zhou, X. Z.; Yu, Z. X.; Huang, H. K.; Uchida, T.; Bronson, R.; Bing, G.; Li, X.; Hunter, T. and Lu, K. P. (2003): Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration, *Nature* (vol. 424), No. 6948, pp. 556-61.
- [148] Holzer, M.; Gartner, U.; Stobe, A.; Hartig, W.; Gruschka, H.; Bruckner, M. K. and Arendt, T. (2002): Inverse association of Pin1 and tau accumulation in Alzheimer's disease hippocampus, *Acta Neuropathol* (vol. 104), No. 5, pp. 471-81.
- [149] Pastorino, L.; Sun, A.; Lu, P. J.; Zhou, X. Z.; Balastik, M.; Finn, G.; Wulf, G.; Lim, J.; Li, S. H.; Li, X.; Xia, W.; Nicholson, L. K. and Lu, K. P. (2006): The prolyl isomerase

- Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production, *Nature* (vol. 440), No. 7083, pp. 528-34.
- [150] Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson (1995): *Molekularbiologie der Zelle* (vol. 3. Auflage), Hans-Joachim Kraus, Karen Weber, Ed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, ISBN: 3-527-30055-4.
 - [151] Ellis, R. J. (2001): Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends Biochem Sci* (vol. 26), No. 10, pp. 597-604.
 - [152] Ellis, R. J. and Minton, A. P. (2006): Protein aggregation in crowded environments, *Biol Chem* (vol. 387), No. 5, pp. 485-97.
 - [153] Abramova, N.; Charniga, C.; Goderie, S. K. and Temple, S. (2005): Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells, *Dev Biol* (vol. 283), No. 2, pp. 269-81.
 - [154] Machka, C.; Kersten, M.; Zobawa, M.; Harder, A.; Horsch, M.; Halder, T.; Lottspeich, F.; Hrabe de Angelis, M. and Beckers, J. (2005): Identification of Dll1 (Delta1) target genes during mouse embryogenesis using differential expression profiling, *Gene Expr Patterns* (vol. 6), No. 1, pp. 94-101.
 - [155] Neidhardt, L.; Gasca, S.; Wertz, K.; Obermayr, F.; Worpenberg, S.; Lehrach, H. and Herrmann, B. G. (2000): Large-scale screen for genes controlling mammalian embryogenesis, using high-throughput gene expression analysis in mouse embryos, *Mech Dev* (vol. 98), No. 1-2, pp. 77-94.
 - [156] Greene, N. D.; Leung, K. Y.; Wait, R.; Begum, S.; Dunn, M. J. and Copp, A. J. (2002): Differential protein expression at the stage of neural tube closure in the mouse embryo, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 44, pp. 41645-51.
 - [157] Zheng, P. Z.; Wang, K. K.; Zhang, Q. Y.; Huang, Q. H.; Du, Y. Z.; Zhang, Q. H.; Xiao, D. K.; Shen, S. H.; Imbeaud, S.; Eveno, E.; Zhao, C. J.; Chen, Y. L.; Fan, H. Y.; Waxman, S.; Auffray, C.; Jin, G.; Chen, S. J.; Chen, Z. and Zhang, J. (2005): Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 102), No. 21, pp. 7653-8.
 - [158] Mijalski, T.; Harder, A.; Halder, T.; Kersten, M.; Horsch, M.; Strom, T. M.; Liebscher, H. V.; Lottspeich, F.; de Angelis, M. H. and Beckers, J. (2005): Identification of coexpressed gene clusters in a comparative analysis of transcriptome and proteome in mouse tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 102), No. 24, pp. 8621-6.
 - [159] Frey, I. M.; Rubio-Aliaga, I.; Siewert, A.; Sailer, D.; Drobyshev, A.; Beckers, J.; de Angelis, M. H.; Aubert, J.; Bar Hen, A.; Fiehn, O.; Eichinger, H. M. and Daniel, H. (2007): Profiling at mRNA, protein, and metabolite levels reveals alterations in renal amino acid handling and glutathione metabolism in kidney tissue of *Pept2*^{-/-} mice, *Physiol Genomics* (vol. 28), No. 3, pp. 301-10.
 - [160] Wang, D. and Gao, L. (2005): Proteomic analysis of neural differentiation of mouse embryonic stem cells, *Proteomics* (vol. 5), No. 17, pp. 4414-26.
 - [161] Chen, S.H.; Wu, P. S.; Chou, C. H.; Yan, Y. T.; Liu, H.; Weng, S. Y. and Yang-Yen, H. F. (2007): A Knockout Mouse Approach Reveals that TCTP Functions as an Essential Factor for Cell Proliferation and Survival in a Tissue- or Cell Type-specific Manner, *Mol Biol Cell*.
 - [162] Hinojosa-Moya, J.; Xoconostle-Cazares, B.; Piedra-Ibarra, E.; Mendez-Tenorio, A.; Lucas, W. J. and Ruiz-Medrano, R. (2008): Phylogenetic and Structural Analysis of Translationally Controlled Tumor Proteins, *J Mol Evol*.
 - [163] Hartl, D.; Irmeler, M.; Romer, I.; Mader, M. T.; Mao, L.; Zabel, C.; de Angelis, M. H.; Beckers, J. and Klose, J. (2008): Transcriptome and proteome analysis of early embryonic mouse brain development, *Proteomics* (vol. 8), No. 6, pp. 1257-1265.

- [164] Hatakeyama, J. and Kageyama, R. (2006): Notch1 expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively regulated by Notch1-independent Hes genes in the developing nervous system, *Cereb Cortex* (vol. 16 Suppl 1), pp. i132-7.
- [165] Basak, O. and Taylor, V. (2007): Identification of self-replicating multipotent progenitors in the embryonic nervous system by high Notch activity and Hes5 expression, *Eur J Neurosci* (vol. 25), No. 4, pp. 1006-22.
- [166] Pinnoji, R. C.; Bedadala, G. R.; George, B.; Holland, T. C.; Hill, J. M. and Hsia, S. C. (2007): Repressor element-1 silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor (REST/NRSF) can regulate HSV-1 immediate-early transcription via histone modification, *Virology* (vol. 4), p. 56.
- [167] Chinnadurai, G. (2003): CtBP family proteins: more than transcriptional corepressors, *Bioessays* (vol. 25), No. 1, pp. 9-12.
- [168] Tojima, T. and Ito, E. (2004): Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons, *Prog Neurobiol* (vol. 72), No. 3, pp. 183-93.
- [169] Laux, T.; Fukami, K.; Thelen, M.; Golub, T.; Frey, D. and Caroni, P. (2000): GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism, *J Cell Biol* (vol. 149), No. 7, pp. 1455-72.
- [170] Dent, E. W. and Gertler, F. B. (2003): Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance, *Neuron* (vol. 40), No. 2, pp. 209-27.
- [171] Watabe-Uchida, M.; Govek, E. E. and Van Aelst, L. (2006): Regulators of Rho GTPases in neuronal development, *J Neurosci* (vol. 26), No. 42, pp. 10633-5.

Anhang

Tabelle 15: Identifizierungsinformation zu den bei APP23- im Vergleich zu Wildtypmäusen unterschiedlich exprimierten Proteinen

Stadium	Spot-ID	p-Wert (t-Test, Trans/WT)	Quotient (Trans/WT)	Proteinname	gi-Nummer	SwissProt Accession	Genname	Funktionelle Kategorie	MS- Tech- nik ^{a)}	Sequenz ab- deckung (%)	Anzahl gematchter Peptide ^{b)}	Mowse Score	Masse (Da)	pI
ET16	ESID845	0.050	0.902	Chain , Adenosine Deaminase (E.C.3.5.4.4) Complexed With 1-Deaza- Adenosine (Daa)	gi 493801	P03958	Ada	Nukleotidmetabolismus	M	44	17	162	39636	5.48
	ESID1471	0.009	1.048	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 51980458	Q9DCX2	Atp5h	Energiemetabolismus	M	68	12	129	19000	5.52
ET16	EBID777	0.027	0.946	Caleyclin-binding protein	gi 3142331	Q9CXXW3	Cacybp	Signaltransduktion	M	71	20	205	28301	7.78
ET16	EBID2576	0.047	0.914	catalase	gi 74223714	Q3UF58	Cat	AS Metabolismus	M	39	18	211	59661	7.72
ET16	ESID1453	0.009	0.889	Chromobox protein homolog 1	gi 5803076	P83917	Cbx1	Transkription	M	48	14	137	21000	4.85
ET16	ESID1555	0.028	0.928	chromobox homolog 3 (Drosophila HP1 gamma),	gi 6680860	Q9DCC5	Cbx3	Transkription	M	45	10	80	20000	4.96
ET16	ESID1307	0.036	0.930	Chloride intracellular channel protein 4	gi 7304963	Q9QYB1	Clic4		M	26	6	80	28711	5.44
ET16	ESID942	0.022	0.875	Proto-oncogene C-crk	gi 31559995	Q64010	Crk	Signaltransduktion	M	50	14	179	33794	5.38

ET16	ESID933	0.008	0.916	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	gi 9055370	Q9QZD9	Eif3s2	Translation	M	33	10	122	36438	5.38
ET16	EBID1940	0.005	0.943	Far upstream element-binding protein 1	gi 84662730	Q91W18	Fubp1	Transkription	M	44	28	238	67401	7.18
ET16	ESID430	0.035	0.824	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	gi 85861218	Q3THK7	Gmps	Nukleotidmetabolismus	M	40	27	234	76675	6.29
ET16	EBID1609	0.019	0.759	HnRNP A1 [Fragment]	gi 85060507	P70370	Hnrpa1	Translation	M	34	10	139	38810	9.17
ET16	ESID878	0.039	0.860	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	gi 6754222	Q99020	Hnrpab	Transkription	M	34	13	151	30812	7.68
ET16	ESID471	0.014	0.945	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	gi 13384620	P61979	Hnrpk	Transkription	M	37	12	131	50944	5.39
ET16	ESID1822	0.013	0.816	Huntingtin-interacting protein HYPK	gi 27229055	Q9CR41	Hypk	Faltung	M	39	7	77	14670	4.91
ET16	ESID316	0.045	0.864	KH-type splicing regulatory protein	gi 74224349	Q3U0V1	Khsp	Translation	M	35	24	229	76762	6.9
ET16	ESID157	0.041	0.943	Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor	gi 6679237	Q05920	Pc	KH Metabolismus	M	36	34	285	129602	6.25
ET16	EBID2180	0.044	1.208	Phosphoglycerate mutase family member 5	gi 30704499	Q8BX10	Pgam5	KH Metabolismus	M	37	11	150	31270	8.98
ET16	EBID641	0.029	0.960	Prohibitin-2	gi 6005854	O35129	Phb2	Transkription	M	49	15	149	33276	9.83
ET16	ESID1521	0.046	0.835	Peroxisedoxin-2	gi 3603241	Q61171	Prdx2	Abbau	M	37	7	115	21778	5.2
ET16	ESID1351	0.007	0.798	Proteasome subunit alpha type 5	gi 7106387	Q9Z2U1	Psm5	Abbau	M	34	9	104	26394	4.74
ET16	EBID946	0.026	0.754	Proteasome subunit beta	gi 3914434	O55234	Psm5	Abbau	M	57	11	178	22952	8.65

1C	BID442	0.017	0.952	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	gi 6680748	Q03265	Atp5a1	Energietabolismus	E	37	21	1269	59716	9.22
1C	SID15830	0.045	1.467	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	gi 6680748	Q03265	Atp5a1	Energietabolismus	E	10	4	264	59716	9.22
1C	SID1468	0.043	1.168	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 21313679	Q9DCX2	Atp5h	Energietabolismus	E	82	12	642	18738	5.52
1C	SID495	0.010	1.049	ATPase, H+ transporting, V1 subunit A, isoform 1	gi 31560731	P50516	Atp6v1a	Energietabolismus	E	34	16	1122	68283	5.42
1C	BID403	0.047	0.945	chaperonin subunit 4 (delta)	gi 6753322	P80315	Cct4	Faltung	E	21	11	591	58030	8.24
1C	SID15241	0.018	0.817	Clathrin light chain B (Lcb)	gi 30794164	Q6IRU5	Cltb	Sortierung	E	13	3	167	23160	4.63
1C	SID2329	0.023	0.905	UMP-CMP kinase	gi 12832572	Q9DCS7	Cmpk	Nukleotidmetabolismus	E	33	6	387	25698	8.13
1C	SID5896	0.045	0.895	copine VI	gi 6753510	Q80W08	Cpnc6		M	15	20	83	61742	5.37
1C	SID1419	0.015	0.851	Proto-oncogene C-crk	gi 423455	Q64010	Crk	Signaltransduktion	M	50	14	179	33794	5.38
1C	BID730	0.004	0.574	Quinone oxidoreductase	gi 13277837	P47199	Cryz	Energietabolismus	E	17	5	286	35276	8.18
1C	SID449	0.049	0.934	postsynaptic density protein 95	gi 6681195	Q62108	Dlg4	Neuron	E	2	1	52	26390	5.56
1C	BID492	0.010	0.940	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	gi 6681273	P10126	Eef1a1	Translation	E	6	3	159	50018	9.16
1C	SID1251	0.046	0.844	elongation factor 1-beta homolog	GI:5902663	O70251	Eef1b	Translation	E	13	2	273	24693	4.47

1C	BID538	0.042	1.122	enolase 1, alpha non-neuron	gi 53734652	Q5FW97	Eno1	KH Metabolismus	E	29	13	807	50209	8.01
1C	SID824	0.019	1.060	enolase 2, gamma neuronal	gi 7305027	P17183	Eno2	KH Metabolismus	E	49	14	995	47267	4.99
1C	BID1543	0.007	1.161	FK506 binding protein 2	gi 6679805	P45878	Fkbp2	Faltung	E	10	1	47	15334	9.05
1C	SID720	0.007	0.930	FK506-binding protein 4	gi 6753882	P30416	Fkbp4	Faltung	E	26	10	557	51540	5.54
1C	SID15193	0.044	0.939	Neuromodulin	gi 20271449	P06837	Gap43	Neuron	E	50	8	582	23618	4.63
1C	BID790	0.025	0.889	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 6679937	P16858	Gapdh	KH Metabolismus	E	6	2	106	35787	8.44
1C	SID5893	0.017	0.815	glial fibrillary acidic protein	gi 51066	P03995	Gfap	Zytoskelett	E	7	3	161	48437	5.29
1C	BID530	0.028	1.053	glutamine synthetase	gi 31982332	P15105	Glul	AS Metabolismus	E	35	12	677	42092	6.64
1C	SID5890	0.040	0.898	glutathione synthetase	gi 6680117	P51855	Gss	AS Metabolismus	E	5	4	241	52214	5.56
1C	BID900	0.003	1.211	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 isoform 2	gi 82950644	Q9CX86	Hnrpa0	Translation	E	31	5	373	30512	9.35
1C	SID633	0.015	0.953	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	gi 74225344	Q3U6X2	Hnrpk	Transkription	M	28	28	91	51031	5.7
1C	SID5651	0.009	1.405	Heat shock cognate 71 kDa protein	gi 309319	P63017	Hspa8	Faltung	E	33	17	1072	70793	5.37
1C	SID631	0.004	0.823	Heat shock protein 9A	gi 903309	P38647	Hspa9a	Faltung	E	7	4	294	73416	5.81
1C	BID1869	0.009	0.870	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	gi 22122643	Q8R071	Itpka	Signaltransduktion	E	26	11	647	50903	7.64
1C	BID775	0.032	0.583	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	gi 975314	P62482	Kcnab2		E	3	1	78	41154	9.19

1C	BID853	0.018	1.042	L-lactate dehydrogenase	gi 74217959	Q3TCI7	Ldha	KH Metabolismus	E	34	10	641	36476	7.62
1C	SID1096	0.014	0.839	lactate dehydrogenase 2, B chain	gi 6678674	P16125	Ldhb	KH Metabolismus	E	23	7	446	36549	5.7
1C	SID1107	0.044	0.875	lactate dehydrogenase 2, B chain	gi 6678674	P16125	Ldhb	KH Metabolismus	E	18	5	277	36549	5.7
1C	BID363	0.022	0.854	Lamin-A/C	gi 52865	P48678	Lmna		E	20	10	759	65367	6.05
1C	SID15230	0.028	0.627	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	gi 41350312	Q60817	Naca	Transkription	E	6	1	94	23370	4.52
1C	BID1234	0.012	0.927	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9	gi 29789148	Q9CQI8	Ndufb9	Energiemetabolismus	E	19	3	171	21970	7.67
1C	SID885	0.049	0.875	NSFL1 cofactor p47 (p97 cofactor)	gi 38198665	Q9CZ44	Nsfl1c	Lipidmetabolismus	E	44	14	836	40928	5.09
1C	SID712	0.003	0.842	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	gi 6754974	Q61644	Pacsin1	Zytoskelett	E	34	11	675	50544	5.15
1C	SID718	0.049	0.945	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	gi 6754974	Q61644	Pacsin1	Zytoskelett	E	43	19	1136	50544	5.15
1C	SID744	0.014	0.778	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	gi 6754974	Q61644	Pacsin1	Zytoskelett	M	36	23	171	50544	5.15
1C	SID1316	0.021	0.920	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB beta subunit (PAF)	gi 3024348	Q61206	Pafah1b2	Lipidmetabolismus	E	5	2	124	25476	5.78

1C	BID1567	0.050	0.725	thioesterase superfamily member 2	gi 13385260	Q9CQR4	Them2		E	15	2	136	15173	8.95
1C	BID1193	0.033	1.110	triosephosphate isomerase	gi 1864018	Q64513	Tpi1	KH Metabolismus	E	33	6	357	22492	5.62
1C	SID4172	0.028	0.918	Ubiquilin-2	gi 34328236	Q9QZM0	Ubqln2	Abbau	E	12	5	280	67308	5.16
1C	SID446	0.030	0.921	Ubiquilin-2	gi 6014493	Q9QZM0	Ubqln2	Abbau	E	12	5	280	67308	5.16
1C	SID4796	0.049	1.214	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3	gi 7710106	Q9JKB1	Uchl3	Abbau	E	36	6	415	26162	5.08
1C	SID632	0.006	0.867	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	1	1	52	89252	5.14
1C	SID1310	0.038	0.858	WW domain binding protein 2	gi 8394539	P97765	Wbp2		E	5	1	70	28013	5.94
1C	SID1294	0.010	1.050	14-3-3 protein gamma	gi 3065929	P61982	Ywhg	Zellwachstum und -tod	E	48	20	114	28285	4.8
1H	BID1104	0.005	0.917	adenylate kinase 2 isoform b	gi 34328230	Q8C719	Ak2	Nukleotidmetabolismus	E	4	1	42	25589	6.97
1H	BID660	0.050	1.087	aldolase 1, A isoform	gi 6671539	Q5FWB7	Aldoa	KH Metabolismus	E	16	7	444	39331	8.31
1H	BID690	0.017	1.085	aldolase 1, A isoform	gi 6671539	Q5FWB7	Aldoa	KH Metabolismus	E	23	8	464	39331	8.31
1H	SID2679	0.027	1.067	Apolipoprotein E	gi 74178217	P08226	Apoe	Lipidmetabolismus	E	26	9	515	35884	5.56
1H	SID2064	0.039	0.871	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 2623222	P56480	Atp5b	Energiemetabolismus	E	17	6	337	56632	5.24
1H	SID15757	0.027	1.102	ATP synthase delta chain, mitochondrial [Precursor]	gi 12847456	Q9D3D9	Atp5d	Energiemetabolismus	E	17	4	236	17619	5.03
1H	SID663	0.001	1.028	chaperonin subunit 5 (epsilon)	gi 6671702	P80316	Cet5	Faltung	E	38	16	1116	59586	5.72

1H	SID15241	0.027	0.859	Clathrin light chain B (Leb)	gi 30794164	Q6IRU5	Cltb	Sortierung	E	13	3	167	23160	4.63
1H	BID1723	0.014	1.055	diazepam binding inhibitor isoform 2	gi 6681137	P31786	Dbi	Lipidmetabolismus	E	32	2	77	9994	8.78
1H	SID507	0.002	1.089	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 1915913	O08553	Dpysl2	Neuron	E	7	3	183	62132	5.95
1H	SID5670	0.007	1.085	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 40254595	O08553	Dpysl2	Neuron	M	23	17	142	62239	5.95
1H	BID529	0.020	1.078	enolase 1, alpha non-neuron	gi 12963491	Q5FW97	Eno1	KH Metabolismus	E	14	6	320	47095	6.37
1H	BID525	0.014	1.062	enolase 1, alpha non-neuron	gi 53734652	Q5XJG8	Eno1	KH Metabolismus	E	19	7	421	50209	8.01
1H	SID1383	0.006	0.893	enolase 2, gamma neuronal	gi 7305027	Q922A0	Eno2	KH Metabolismus	E	4	2	91	47267	4.99
1H	SID1724	0.018	0.902	Fatty acid-binding protein, epidermal	gi 6754450	Q05816	Fabp5	Lipidmetabolismus	E	32	4	236	15127	6.14
1H	BID412	0.015	0.865	Fascin (Singed-like protein)	gi 2498358	Q61553	Fscn1	Zytoskelett	E	12	6	300	54371	6.21
1H	SID15193	0.033	0.921	Neuromodulin	gi 20271449	P06837	Gap43	Neuron	E	50	8	582	23618	4.63
1H	BID783	0.018	1.096	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 6679937	P16858	Gapdh	KH Metabolismus	E	21	5	355	35787	8.44
1H	BID784	0.015	1.081	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 6679937	P16858	Gapdh	KH Metabolismus	E	31	9	626	35787	8.44
1H	SID576	0.013	0.935	guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1	gi 18139889	P50396	Gdi1	Signaltransduktion	E	35	12	786	50479	4.96
1H	SID5893	0.028	0.642	glial fibrillary acidic protein	gi 51066	P03995	Gfap	Zytoskelett	E	7	3	161	48437	5.29
1H	SID1256	0.048	0.942	Glod4 protein	gi 12840311	Q9CPV4	Glod4	Metabolism	E	45	12	776	33296	5.28

1H	SID15240	0.004	0.891	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	P62874	Gnb1	Signaltransduktion	E	9	3	175	37353	5.96
1H	BID721	0.025	0.914	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 6754036	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	37	17	1047	47381	9.13
1H	BID1132	0.048	1.137	glutathione S-transferase, mu 1	gi 6754084	Q58ET5	Gstm1	AS Metabolismus	E	55	13	724	25953	7.71
1H	BID1632	0.026	1.304	alpha-globin	gi 193761	Q61649	Hba-a1		E	44	2	87	6212	6.82
1H	BID206	0.003	0.895	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	gi 31982273	P51660	Hsd17b4	Lipidmetabolismus	E	6	4	245	79432	8.76
1H	SID530	0.041	1.106	heat shock protein 2 [Mus musculus]	gi 31560686	P17156	Hspa9	Faltung	E	45	28	1661	69599	5.51
1H	BID549	0.045	1.028	mitogen activated protein kinase kinase 1	gi 6678794	P31938	Map2k1	Signaltransduktion	E	10	4	233	43446	6.24
1H	SID1242	0.005	0.932	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	gi 7106301	Q61166	Mapr1	Zytoskelett	E	14	2	135	29997	5.12
1H	SID1186	0.023	0.941	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	gi 387129	P14152	Mdh1	KH Metabolismus	E	15	5	279	36454	6.16
1H	SID482	0.021	1.478	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	gi 21704020	Q91VD9	Ndufs1	Energiemetabolismus	E	5	3	184	79698	5.51
1H	BID1667	0.009	0.828	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6	gi 56711244	P52503	Ndufs6	Energiemetabolismus	E	33	4	272	13012	8.87
1H	BID1180	0.032	0.952	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	gi 417489	P23506	Pcm1	Protein modification	E	9	2	130	24619	7.1

1H	SID1118	0.043	0.800	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	gi 18152793	Q9D051	Pdhb	KH Metabolismus	E	6	2	124	38912	6.41
1H	BID197	0.022	0.906	6-phosphofructokinase, muscle type (Phosphofructokinase 1) (Phosphohexokinase) (Phosphofructo-1-kin	gi 13638207	P47857	Pfkfb	KH Metabolismus	E	18	13	735	85215	8.24
1H	BID1439	0.029	1.050	peptidylprolyl isomerase A	gi 6679439	P17742	Ppia	Faltung	E	37	7	384	17960	7.74
1H	BID1458	0.035	1.075	Peptidylprolyl isomerase A	gi 12846244	P17742	Ppia	Faltung	E	28	4	266	17960	7.74
1H	BID1274	0.019	0.933	peroxiredoxin 1	gi 6754976	P35700	Prdx1	Abbau	E	20	5	224	22162	8.26
1H	BID1260	0.026	1.339	prion interactor PINT1	gi 14581470	Q923K5	Prnpip1		E	7	1	46	14033	5.11
1H	SID1301	0.026	0.952	Proteasome subunit alpha type 3	gi 31981534	O70435	Psma3	Abbau	E	25	7	350	28387	5.29
1H	SID1375	0.030	0.969	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5	gi 7106387	Q5E987	Psma5	Abbau	E	17	3	216	26394	4.74
1H	BID644	0.033	1.051	Transcriptional activator protein Pur-alpha	gi 6679573	P42669	Pura	Zellwachstum und -tod	E	11	4	205	34862	6.07
1H	BID1828	0.031	0.806	Septin-11	gi 26324430	Q8C1B7	Sept11	Zytoskelett	E	17	6	388	49649	8.73
1H	BID678	0.000	1.061	Neuronal-specific septin-3	gi 13124538	Q9Z1S5	Sept3	Zytoskelett	E	4	2	99	52756	7.45
1H	BID516	0.028	0.856	Septin-7	gi 28173550	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	25	11	639	50617	8.73
1H	BID515	0.034	0.865	splicing factor 3b, subunit 4	gi 23346437	Q8QZY9	Sf3b4	Translation	E	3	1	71	44327	8.54
1H	SID15685	0.048	1.119	synuclein, alpha	gi 6678047	O55042	Snca		M	45	8	99	14476	4.74

1H	SID15696	0.047	1.159	synuclein, alpha	gi 6678047	O55042	Snca		M	45	8	99	14476	4.74
1H	SID1158	0.044	0.871	spermidine synthase	gi 6678131	Q64674	Srm	AS Metabolismus	E	9	2	144	33973	5.31
1H	BID221	0.016	2.190	Synapsin-2	gi 42406392	Q64332	Syn2	Neuron	E	10	5	332	63202	8.59
1H	BID229	0.008	1.370	Synapsin-2	gi 42406392	Q64332	Syn2	Neuron	E	13	6	347	63202	8.59
1H	BID1158	0.035	1.053	triosephosphate isomerase	gi 1864018	P17751	Tpi1	KH Metabolismus	E	41	9	534	22492	5.62
1H	BID1193	0.009	1.142	triosephosphate isomerase	gi 1864018	Q64513	Tpi1	KH Metabolismus	E	33	6	357	22492	5.62
1H	SID1391	0.042	0.889	Translationally-controlled tumor protein	gi 6678437	P63028	Tpt1	Signaltransduktion	E	26	5	274	19450	5.62
1H	SID1395	0.025	0.947	Translationally-controlled tumor protein	gi 6678437	P63028	Tpt1	Signaltransduktion	E	33	6	307	19450	5.62
1H	SID15814	0.006	0.925	Thioredoxin	gi 14789654	P10639	Txn	Energiemetabolismus	E	38	4	251	11668	4.8
1H	SID1049	0.021	0.921	Thioredoxin-like protein 1	gi 31543902	Q8CDN6	Txnl1	Energiemetabolismus	M	41	8	143	32217	4.84
2C	BID1875	0.019	0.923	4-aminobutyrate aminotransferase	gi 37202121	P61922	Abat	AS Metabolismus	E	22	9	586	50205	8.79
2C	BID709	0.021	1.154	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	gi 13435978	Q8CAY6	Acat2	AS Metabolismus	E	7	2	117	38123	7.63
2C	SID15765	0.049	0.786	alpha-cardiac actin	gi 387090	P68033	Actc1	Zytoskelett	E	5	2	113	41758	5.23
2C	SID2679	0.014	1.261	Apolipoprotein E	gi 74178217	P08226	Apoe	Lipidmetabolismus	E	26	9	515	35884	5.56
2C	SID1437	0.049	1.137	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 21313679	Q9DCX2	Atp5h	Energiemetabolismus	E	40	6	363	18738	5.52
2C	SID15879	0.023	1.118	ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial	gi 7949005	P97450	Atp5j	Energiemetabolismus	E	46	4	220	12489	9.36

2C	SID371	0.009	1.179	Dynammin-1	gi 32172431	P39053	Dnm1	Zytoskelett	E	4	4	217	97741	7.61
2C	SID378	0.015	1.120	Dynammin-1	gi 32172431	P39053	Dnm1	Zytoskelett	E	14	11	689	97741	5.97
2C	SID507	0.045	1.206	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 1915913	O08553	Dpysl2	Neuron	E	7	3	183	62132	5.95
2C	SID536	0.021	1.077	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 1915913	O08553	Dpysl2	Neuron	E	9	3	219	62132	5.95
2C	SID5670	0.041	1.087	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 40254595	O08553	Dpysl2	Neuron	M	23	17	142	62239	5.95
2C	SID2333	0.010	0.932	Dual specificity protein phosphatase 3	gi 21312314	Q9D7X3	Dusp3	Signaltransduktion	E	13	2	116	20459	6.07
2C	SID439	0.007	1.160	cytoplasmic dynein intermediate chain 1B	gi 3493589	O88485	Dync1i1	Sortierung	E	3	1	96	68422	5.13
2C	SID15301	0.001	1.215	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	4	1	52	25084	4.98
2C	SID15303	0.015	0.771	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	16	3	191	25084	4.98
2C	SID15307	0.013	1.575	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	5	1	58	25084	4.98
2C	SID15308	0.024	0.771	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	39	8	500	25084	4.98
2C	SID406	0.014	0.421	epsin 1	gi 46195711	Q80VP1	Epn1	Lipidmetabolismus	E	7	3	194	60175	4.69
2C	SID424	0.006	0.491	epsin 1	gi 46195711	Q80VP1	Epn1	Lipidmetabolismus	E	17	7	413	60175	4.69
2C	SID873	0.021	0.900	Neuromodulin	gi 6679935	P06837	Gap43	Neuron	E	50	8	582	23618	4.63

2C	SID1255	0.034	0.814	Glod4 protein	gi 12840311	Q9CPV4	Glod4	Metabolism	E	7	2	105	30765	4.8
2C	SID1062	0.009	0.947	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	P62874	Gnb1	Signaltransduktion	E	25	8	532	37353	5.6
2C	SID5633	0.046	0.835	Gelsolin [Precursor]	gi 18606238	P13020	Gsn	Zytoskelett	E	20	12	774	80712	5.52
2C	BID230	0.006	0.901	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (Trifunctional protein), alpha subunit	gi 33859811	Q5U5Y5	Hadha	Lipidmetabolismus	E	13	7	483	82618	9.24
2C	BID234	0.020	0.865	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (Trifunctional protein), alpha subunit	gi 33859811	Q5U5Y5	Hadha	Lipidmetabolismus	E	19	12	770	82618	9.24
2C	SID1216	0.033	0.889	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2 isoform 1	gi 12833114	Q3UGR5	Hdh2	Metabolism	E	18	3	322	26635	5.81
2C	BID532	0.020	0.933	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	gi 94388210	Q8BG05	Hnmpa3	Translation	E	17	4	263	37185	8.46
2C	SID680	0.045	1.081	heat shock protein 65	gi 51455	P63038	Hspd1	Faltung	E	41	19	1434	60903	5.91
2C	SID1063	0.042	1.078	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	gi 18250284	Q9D6R2	Idh3a	KH Metabolismus	E	7	3	177	39613	6.27
2C	SID420	0.002	1.069	Mitochondrial inner membrane protein	gi 26339872	Q8CAQ8	Immt		E	21	14	757	82878	6.18

2C	BID208	0.006	1.725	KH domain-containing, RNA-binding, Signaltransduktion- associated protein 1	gi 602251	Q60749	Khdrbs1	Transkription	E	2	1	43	48456	8.92
2C	BID219	0.009	1.436	KH domain-containing, RNA-binding, Signaltransduktion- associated protein 1	gi 602251	Q60749	Khdrbs1	Transkription	E	11	4	227	48455	8.92
2C	BID871	0.033	0.907	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	gi 126897	P08249	Mdh2	KH Metabolismus	E	11	3	150	35574	8.83
2C	SID15643	0.000	0.757	39S ribosomal protein L12, mitochondrial [Precursor]	gi 12837801	Q9DB15	Mrpl12	Translation	E	30	7	348	21695	9.34
2C	SID15744	0.002	1.134	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	My16	Zytoskelett	E	31	4	277	16919	4.56
2C	BID738	0.015	0.891	Poly(rC)-binding protein 2	gi 495128	Q61990	Pcbp2	Transkription	E	20	5	294	34994	8.48
2C	BID1832	0.013	0.853	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	gi 6679261	P35486	Pdha1	KH Metabolismus	M	48	23	130	43204	8.49
2C	SID15784	0.024	0.762	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	gi 21426847	Q62048	Pea15	Signaltransduktion	E	7	1	58	15045	4.94
2C	SID15785	0.024	0.785	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	gi 23398567	Q62048	Pea15	Signaltransduktion	E	7	1	58	15045	4.94
2C	SID15777	0.003	1.941	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	gi 21426847	Q62048	Pea15	Signaltransduktion	E	7	1	89	15045	4.94
2C	SID15624	0.049	1.222	Phosphatidylethanolamine- binding protein 1	gi 1517864	P70296	Pebp1	Lipidmetabolismus	E	6	1	75	20847	5.19
2C	BID595	0.005	0.930	Phosphoglycerate kinase 1	gi 129903	P09411	Pgk1	KH Metabolismus	E	34	10	681	44508	7.53

2C	BID601	0.003	0.630	guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 6 isoform 1	gi 83921581	Q8CEA6	Psd3	Signaltransduktion	E	15	8	425	58430	8.92
2C	BID591	0.050	0.784	SEC14-like protein 2	gi 21362309	Q99J08	Sec14I2	Lipidmetabolismus	E	13	4	201	46271	6.69
2C	BID1828	0.004	0.845	Septin-11	gi 26324430	Q8C1B7	Sept11	Zytoskelett	E	17	6	388	49649	6.14
2C	SID1013	0.047	0.877	Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (Ovalbumin), member 1a	gi 56206897	Q5SUV7	Serpinb1a		E	5	2	116	42573	6.22
2C	BID414	0.010	0.662	Signal recognition particle 54 kDa protein	gi 54194	P14576	Srp54	Sortierung	E	22	9	643	55709	8.96
2C	SID15699	0.006	0.794	Stathmin	gi 9789995	P54227	Stmn1	Signaltransduktion	E	29	5	234	17264	5.76
2C	BID253	0.010	1.095	synapsin I	gi 1041085	O88935	Syn1	Neuron	E	18	1	104	12232	8.31
2C	BID200	0.005	1.728	synapsin Ib	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	11	6	402	69992	9.84
2C	BID201	0.013	1.419	synapsin Ib	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	9	4	273	69992	9.84
2C	BID211	0.002	1.487	synapsin Ib	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	9	4	269	69991	9.84
2C	BID215	0.007	0.763	synapsin Ib	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	25	12	781	69991	9.84
2C	BID222	0.024	0.814	synapsin Ib	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	25	12	701	69992	9.84
2C	SID15214	0.046	0.963	Tropomodulin-2	gi 6934242	Q9JIKK7	Tmod2	Zytoskelett	E	29	9	474	39547	5.28
2C	BID919	0.042	0.885	Mitochondrial import receptor subunit TOM34 (Translocase of outer membrane 34 kDa subunit)	gi 24212072	Q9CYG7	Tomm34	Faltung	E	22	6	340	34257	9.24

2C	SID15319	0.020	0.953	Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin)	gi 205222240	Q564G1	Tpm1	Zytoskelett	E	25	8	383	32689	4.71
2C	BID1889	0.017	0.812	UBX domain-containing protein 1	gi 13277354	Q99PL6	Ubxdl		E	13	4	258	49765	8.7
2H	BID1875	0.048	0.870	4-aminobutyrate aminotransferase	gi 37202121	P61922	Abat	AS Metabolismus	E	22	9	586	50205	8.79
2H	BID573	0.016	0.828	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	gi 29126205	Q8BWT1	Acaa2	Lipidmetabolismus	E	14	4	232	41803	8.33
2H	SID927	0.000	0.922	Actin, cytoplasmic 1	gi 49868	P60710	Actb	Zytoskelett	E	14	4	251	39161	5.78
2H	SID15765	0.017	0.847	alpha-cardiac actin	gi 387090	P68033	Actc1	Zytoskelett	E	5	2	113	41758	5.23
2H	SID15213	0.007	0.959	gamma-actin	gi 809561	P63260	Actg1	Zytoskelett	E	22	8	462	40992	5.56
2H	SID897	0.028	0.944	gamma-actin	gi 809561	P63260	Actg1	Zytoskelett	E	38	12	708	40992	5.56
2H	SID910	0.036	0.938	gamma-actin	gi 809561	P63260	Actg1	Zytoskelett	E	27	9	487	40992	5.56
2H	BID419	0.038	0.967	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1	gi 19527258	Q1LZK2	Aldh6a1	AS Metabolismus	E	22	9	591	57878	8.29
2H	BID650	0.036	1.115	aldolase 1, A isoform	gi 6671539	Q5FWB7	Aldoa	KH Metabolismus	E	52	19	1148	39331	8.31
2H	SID15202	0.001	0.858	apolipoprotein A-IV precursor - mouse	gi 91885	Q01488	Apoa4	Lipidmetabolismus	E	15	4	274	45455	5.77
2H	SID985	0.016	0.905	ADP-ribosylation factor interacting protein 2	gi 31981363	Q8K221	Arfp2	Signaltransduktion	E	12	3	233	37776	5.72
2H	SID5668	0.003	1.136	ATPase, H+ transporting, V1 subunit A, isoform 1	gi 31560731	P50516	Atp6v1a	Energiemetabolismus	E	34	16	1122	68283	5.42
2H	SID729	0.001	1.103	vacuolar H+ATPase B2	gi 17105370	P62814	Atp6v1b2	Energiemetabolismus	E	36	18	1112	56515	5.57

2H	SID746	0.014	0.860	vacuolar H+ATPase B2	gi 17105370	P62814	Ap6v1b2	Energiemetabolismus	E	11	5	314	56515	5.57
2H	SID15671	0.041	3.282	hypothetical protein LOC68165	gi 12845489	Q9CV00	B230118G17Rik	Energiemetabolismus	E	14	2	128	18107	5.51
2H	SID918	0.014	0.915	bisphosphate 3'- nucleotidase 1	gi 15029655	Q3U449	Bpnt1	Energiemetabolismus	M	28	7	76	33000	5.58
2H	SID1358	0.046	0.861	calbindin 2	gi 34098931	Q08331	Calb2	Signaltransduktion	E	14	3	155	28105	4.92
2H	SID4795	0.047	0.920	calbindin 2	gi 34098931	Q8CCS7	Calb2	Signaltransduktion	E	14	3	155	28105	4.92
2H	SID663	0.014	1.068	chaperonin subunit 5 (epsilon)	gi 6671702	P80316	Cct5	Faltung	E	38	16	1116	59586	5.72
2H	BID1868	0.005	1.268	suppressor of K+ transport defect 3	gi 6677983	Q60649	Clpb	Transkription	E	15	8	474	75956	8.68
2H	SID15251	0.035	0.911	Clathrin light chain B (Lcb)	gi 62510439	Q6IRU5	Cltb	Sortierung	E	34	10	520	25156	4.56
2H	SID15750	0.001	0.896	Complexin-1	gi 62471462	P63040	Cplx1	Sortierung	E	38	4	323	15112	4.93
2H	BID1723	0.049	0.969	diazepam binding inhibitor isoform 2	gi 6681137	P31786	Dbi	Lipidmetabolismus	E	32	2	77	9994	8.78
2H	SID1027	0.000	0.865	NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	gi 38371755	Q9CWS0	Ddah1	Signaltransduktion	E	41	12	602	31361	5.64
2H	SID449	0.019	0.972	postsynaptic density protein 95	gi 6681195	Q62108	Dlg4	Neuron	E	2	1	52	26390	5.56
2H	SID507	0.000	1.248	Dihydropyrimidinase- related protein 2	gi 1915913	O08553	Dpysl2	Neuron	E	7	3	183	62132	5.95
2H	SID536	0.006	1.079	Dihydropyrimidinase- related protein 2	gi 1915913	O08553	Dpysl2	Neuron	E	9	3	219	62132	5.95

2H	SID5670	0.026	1.056	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 40254595	O08553	Dpysl2	Neuron	M	23	17	142	62239	5.95
2H	SID569	0.014	0.905	Dihydropyrimidinase-related protein 3	gi 6681219	Q62188	Dpysl3		E	7	3	182	61897	6.04
2H	SID15301	0.024	1.381	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	4	1	52	25084	4.98
2H	SID15303	0.012	0.734	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	16	3	191	25084	4.98
2H	SID15308	0.030	0.815	EF-hand domain-containing protein 2	gi 12847201	Q9D8Y0	Efh42	Translation	E	39	8	500	25084	4.98
2H	BID301	0.015	0.704	eukaryotic translation initiation factor 2A	gi 26347343	Q96EW9	Eif2a	Translation	E	5	2	152	64996	9.08
2H	BID689	0.034	0.892	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 (gamma)	gi 18079341	Q91WK2	Eif3s3	Translation	E	19	7	485	39807	6.2
2H	BID538	0.003	1.059	enolase 1, alpha non-neuron	gi 53734652	Q5FW97	Eno1	KH Metabolism	E	29	13	807	50209	8.01
2H	SID829	0.024	1.203	enolase 2, gamma neuronal	gi 7305027	P17183	Eno2	KH Metabolism	E	12	4	268	47267	4.99
2H	SID406	0.012	0.735	epsin 1	gi 46195711	Q80VP1	Epn1	Lipidmetabolism	E	7	3	194	60175	4.69
2H	SID424	0.007	0.488	epsin 1	gi 46195711	Q80VP1	Epn1	Lipidmetabolism	E	17	7	413	60175	4.69
2H	SID998	0.003	0.879	SPFH domain family, member 2	gi 23956396	Q8BFZ9	Erlin2		E	13	5	366	37849	5.37
2H	SID15823	0.033	0.921	Fatty acid-binding protein, heart	gi 387397	Q91W23	Fabp3	Lipidmetabolism	E	35	4	205	14810	6.11
2H	SID1724	0.029	0.895	Fatty acid-binding protein,	gi 6754450	Q0S816	Fabp5	Lipidmetabolism	E	32	4	236	15127	6.14

2H	SID545	0.017	0.916	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	gi 13384620	P61979	Hnrpk	Transkription	E	28	12	634	50944	5.39
2H	SID806	0.017	0.498	Homer protein homolog 1 (VASP/Ena-related gene up-regulated during seizure and LTP) (Vesl-1)	gi 38605093	Q9Z2Y3	Homer1	Signaltransduktion	E	26	8	538	41388	5.39
2H	SID480	0.041	1.084	78 kDa glucose-regulated protein [Precursor], Bip	gi 2598562	P20029	Hspa5	Faltung	E	30	16	1072	72378	5.07
2H	SID527	0.022	1.181	Heat shock protein 8	gi 42542422	Q6NZD0	Hspa8	Faltung	E	40	20	1361	70648	5.22
2H	SID530	0.042	1.044	heat shock protein 2 [Mus musculus]	gi 31560686	P17156	Hspa9	Faltung	E	45	28	1661	69599	5.51
2H	SID496	0.048	1.040	Heat shock protein 9A	gi 74219319	Q7TSZ0	Hspa9a	Faltung	E	1578	24	42	73416	5.81
2H	SID684	0.029	1.028	heat shock protein 65	gi 51455	P63038	Hspd1	Faltung	E	42	21	1380	60903	5.91
2H	BID208	0.000	1.662	KH domain-containing, RNA-binding, Signaltransduktion-associated protein 1	gi 602251	Q60749	Khdrbs1	Transkription	E	2	1	43	48456	8.92
2H	BID219	0.000	1.352	KH domain-containing, RNA-binding, Signaltransduktion-associated protein 1	gi 602251	Q60749	Khdrbs1	Transkription	E	11	4	227	48455	8.92
2H	BID549	0.019	0.836	mitogen activated protein kinase 1	gi 6678794	P31938	Map2k1	Signaltransduktion	E	10	4	233	43446	6.24
2H	SID1242	0.001	0.923	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	gi 7106301	Q61166	Mapre1	Zytoskelett	E	14	2	135	29997	5.12

2H	SID1186	0.003	0.939	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	gi 387129	P14152	Mdh1	KH Metabolismus	E	15	5	279	36454	6.16
2H	BID818	0.013	1.093	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	gi 31982186	P08249	Mdh2	KH Metabolismus	E	51	15	944	35589	8.93
2H	BID872	0.023	1.120	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	gi 31982186	P08249	Mdh2	KH Metabolismus	E	51	12	947	35589	8.93
2H	SID15853	0.018	0.932	Myotrophin	gi 6679961	P62774	Mtpn		E	27	2	127	12853	5.27
2H	SID1033	0.002	0.839	Gamma-soluble NSF attachment protein	gi 26355647	Q8C1T5	Napg	Sortierung	E	34	11	667	34710	5.31
2H	SID473	0.041	0.929	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	gi 21704020	Q91VD9	Ndufs1	Energiemetabolismus	E	14	8	443	79698	5.51
2H	SID5655	0.013	0.925	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	gi 21704020	Q91VD9	Ndufs1	Energiemetabolismus	E	18	10	672	79698	5.51
2H	SID15714	0.036	0.561	neuron derived neurotrophic factor	gi 13384818	Q9CQ45	Nenf	Signaltransduktion	E	30	4	271	18893	5.13
2H	SID876	0.004	0.796	NSFL1 cofactor p47 (p97 cofactor)	gi 38198665	Q9CZ44	Nsfl1c	Lipidmetabolismus	E	44	14	836	40928	5.09
2H	SID715	0.030	0.957	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	gi 42415475	P09103	P4hb	Faltung	E	42	10	516	57023	4.77
2H	SID755	0.017	0.860	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	gi 6754974	Q61644	Pacsin1	Zytoskelett	E	32	13	744	50544	5.15
2H	SID749	0.035	0.913	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	gi 46559412	Q61644	Pacsin1	Zytoskelett	E	43	19	1136	50544	5.15

2H	SID1316	0.006	0.939	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB beta subunit (PAF acetylhydrolase 30 kDa subunit) (PA	gi 3024348	Q61206	Pafah1b2	Lipidmetabolismus	E	5	2	124	25476	5.78
2H	BID1178	0.010	0.895	Protein-L-isoaspartate(D- aspartate) O- methyltransferase	gi 417489	P23506	Pemt1	Protein modification	E	47	11	734	24619	7.1
2H	SID15784	0.036	0.792	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	gi 21426847	Q62048	Pea15	Signaltransduktion	E	7	1	58	15045	4.94
2H	SID15785	0.012	0.825	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	gi 23398567	Q62048	Pea15	Signaltransduktion	E	7	1	58	15045	4.94
2H	SID1445	0.046	0.918	Phosphatidylethanolamine- binding protein 1	gi 74222953	Q5EBQ2	Pebp1	Lipidmetabolismus	E	6	1	75	20847	5.19
2H	BID214	0.000	1.601	6-phosphofructokinase, muscle type (Phosphofructokinase 1) (Phosphohexokinase) (Phosphofructo-1-kin	gi 13638207	P47857	Pfkm	KH Metabolismus	E	14	8	498	85215	8.24
2H	SID15780	0.028	1.058	profilin 2	gi 9506971	Q9JIV2	Pfn2	Zytoskelett	E	32	4	211	15022	6.55
2H	BID1073	0.050	0.953	Phosphoglycerate mutase 1	gi 53236962	Q9DBI1	Pgam1	KH Metabolismus	E	48	12	761	28685	6.67
2H	BID595	0.035	0.957	Phosphoglycerate kinase 1	gi 129903	P09411	Pgk1	KH Metabolismus	E	34	10	681	44508	7.53
2H	BID603	0.034	0.895	Phosphoglycerate kinase 1	gi 129903	P09411	Pgk1	KH Metabolismus	E	33	11	672	44522	7.53
2H	BID604	0.013	0.880	Phosphoglycerate kinase 1	gi 129903	P09411	Pgk1	KH Metabolismus	E	37	14	888	44508	7.53
2H	BID1444	0.026	1.152	protein (peptidyl-prolyl	gi 12963653	Q9QUR7	Pin1	Zellwachstum und -tod	E	36	4	273	18359	8.93

2H	SID763	0.009	0.918	reticulocalbin 2	gi 74146742	Q3TE95	Rcn2		E	36	9	639	41014	4.46
2H	SID905	0.032	0.919	protein 40kD	gi 226005	P14206	Rpsa	Translation	E	20	5	298	32732	4.8
2H	SID774	0.012	0.886	Secemin-1	gi 26328385	Q9CZC8	Scrn1	Sortierung	E	19	8	448	46296	4.72
2H	BID591	0.012	0.808	SEC14-like protein 2	gi 21362309	Q99J08	Sec14l2	Lipidmetabolismus	E	13	4	201	46271	6.69
2H	BID631	0.012	0.924	Septin-5	gi 83305642	Q9Z2Q6	Sept5	Zytoskelett	E	26	9	474	42721	6.21
2H	BID1876	0.009	0.711	Septin-7	gi 9789726	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	10	4	251	50518	8.73
2H	BID555	0.006	0.832	Septin-7	gi 9789726	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	2	1	57	50518	8.73
2H	BID516	0.016	0.839	Septin-7	gi 28173550	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	25	11	639	50617	8.73
2H	SID740	0.032	0.916	Septin-8	gi 29612695	Q8CHH9	Sept8	Zytoskelett	E	11	5	308	52647	5.96
2H	SID585	0.035	0.682	Serine protease inhibitor A3K [Precursor]	gi 54173	Q62257	Serpina3k		E	22	5	410	46643	5.04
2H	SID1013	0.046	0.848	Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (Ovalbumin), member 1a	gi 56206897	Q5SUUV7	Serpinb1a		E	5	2	116	42573	6.22
2H	BID858	0.018	1.098	sideroflexin 3	gi 16716499	Q91V61	Sfxn3		E	32	9	568	35384	9.58
2H	BID278	0.023	1.036	Syntaxin-binding protein 1	gi 6981602	O08599	Stxbp1	Sortierung	E	13	8	453	67526	6.49
2H	SID1203	0.027	0.725	succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	gi 46849708	Q9ZZ19	Suc1a2	KH Metabolismus	E	27	12	109	50082	6.57
2H	BID225	0.012	0.852	Synapsin-2	gi 42406392	Q64332	Syn2	Neuron	E	22	10	690	63202	8.59
2H	BID229	0.016	0.864	Synapsin-2	gi 42406392	Q64332	Syn2	Neuron	E	13	6	347	63202	8.59
2H	BID231	0.020	0.838	Synapsin-2	gi 42406392	Q64332	Syn2	Neuron	E	10	5	341	63202	8.59

2H	BID232	0.014	0.810	Synapsin-2	gi 42406392	Q64332	Syn2	Neuron	E	10	5	350	63202	8.59
2H	BID200	0.002	1.479	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	11	6	402	69992	9.84
2H	BID201	0.012	1.315	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	9	4	273	69992	9.84
2H	BID202	0.000	0.719	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	13	7	407	69991	9.84
2H	BID211	0.012	1.454	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	9	4	269	69991	9.84
2H	BID215	0.015	0.809	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	25	12	781	69991	9.84
2H	BID222	0.021	0.881	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	25	12	701	69992	9.84
2H	BID227	0.015	1.165	synapsin lb	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	24	13	774	69992	9.84
2H	BID1280	0.019	1.243	carboxyl-terminal modulator protein	gi 110626050	Q3UUI3	Them4		M	ka	3	221	26015	9.67
2H	SID1266	0.017	0.921	thiamine triphosphatase	gi 23346499	Q8IZL3	Thtpa	Cofactor Metabolism	E	22	4	258	24249	4.67
2H	SID15312	0.010	0.873	toll interacting protein	gi 13591860	Q9QZ06	Tollip	Immune system	E	18	5	302	30325	5.04
2H	BID1160	0.018	1.032	triosephosphate isomerase	gi 1864018	P17751	Tpi1	KH Metabolismus	E	54	10	639	22492	5.62
2H	BID1185	0.010	0.936	triosephosphate isomerase	gi 1864018	Q64513	Tpi1	KH Metabolismus	E	26	4	271	22492	5.62
2H	SID15319	0.015	0.957	Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin)	gi 205222240	Q564G1	Tpm1	Zytoskelett	E	25	8	383	32689	4.71
2H	SID15313	0.004	0.923	Tropomyosin alpha-3 chain	gi 54912	P21107	Tpm3	Zytoskelett	E	37	11	668	29003	4.75
2H	SID15315	0.024	0.900	Tropomyosin alpha-3 chain	gi 54912	P21107	Tpm3	Zytoskelett	E	37	11	668	29003	4.75
2H	SID15316	0.025	0.966	Tropomyosin alpha-3 chain	gi 54912	P21107	Tpm3	Zytoskelett	E	37	11	668	29003	4.75
2H	SID15318	0.030	0.879	Tropomyosin alpha-3 chain	gi 54912	P21107	Tpm3	Zytoskelett	E	27	8	456	29003	4.57
2H	BID589	0.003	0.770	Tu translation elongation	gi 27370092	Q8BFR5	Tufm	Translation	E	13	6	419	49477	7.23

7C	BID539	0.002	1.144	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial [Precursor]	gi 5103680	Q9R0X4	Aco9	Xenobiotics	E	13	6	295	50458	8.73
7C	SID927	0.048	0.953	Actin, cytoplasmic 1	gi 49868	P60710	Actb	Zytoskelett	E	14	4	251	39161	8.16
7C	SID15761	0.049	0.711	Actin, cytoplasmic 1	gi 74190672	P60710	Actb	Zytoskelett	E	5	2	101	41738	5.78
7C	SID15200	0.001	1.100	gamma-actin	gi 809561	P63260	Actg1	Zytoskelett	E	10	3	150	40992	5.02
7C	BID780	0.026	0.882	annexin A2	gi 6996913	P07356	Anxa2	Zytoskelett	E	16	5	273	38585	4.95
7C	SID2679	0.026	1.093	Apolipoprotein E	gi 114041	P08226	Apoe	Lipidmetabolismus	E	31	10	620	35844	5.29
7C	SID985	0.029	0.947	ADP-ribosylation factor interacting protein 3	gi 31981363	Q8K221	Arfp2	Signaltransduktion	E	12	3	233	37776	7.71
7C	SID775	0.013	0.915	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 23272966	P56480	Atp5b	Energiemetabolismus	E	19	7	624	56632	5.90
7C	SID772	0.040	1.053	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 23272966	P56480	Atp5b	Energiemetabolismus	E	37	15	960	56632	5.7
7C	SID15757	0.001	1.151	ATP synthase delta chain, mitochondrial [Precursor]	gi 12847456	Q9D3D9	Atp5d	Energiemetabolismus	E	17	4	236	17619	8.42
7C	SID15618	0.044	1.052	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 21313679	Q9DCX2	Atp5h	Energiemetabolismus	E	17	3	157	18738	7.62
7C	SID1468	0.002	1.237	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 21313679	Q9DCX2	Atp5h	Energiemetabolismus	E	82	12	642	18738	5.33
7C	SID15879	0.007	1.079	ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial [Precursor]	gi 7949005	P97450	Atp5j	Energiemetabolismus	E	46	4	220	12489	5.36

7C	SID5669	0.003	1.087	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit A, isoform 1	gi 1718086	P50516	Atp6v1a	Energiemetabolismus	E	21	10	651	68224	8.26
7C	BID1084	0.005	0.973	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial [Precursor]	gi 20072952	Q9JLZ3	Auh	AS Metabolismus	E	34	10	539	32621	5.39
7C	SID389	0.036	1.069	Myc box-dependent-interacting protein 1	gi 6753050	O08539	Bin1	Zellwachstum und -tod	E	20	8	471	64430	5.31
7C	SID403	0.040	1.072	Myc box-dependent-interacting protein 1	gi 6753050	O08539	Bin1	Zellwachstum und -tod	E	12	5	364	64430	7.63
7C	SID958	0.047	1.170	bisphosphate 3'-nucleotidase 1	gi 39652626	Q3U449	Bpnt1	Energiemetabolismus	M	28	7	76	33000	8.96
7C	SID4797	0.006	1.211	calbindin 2	gi 34098931	Q8CCS7	Calb2	Signaltransduktion	E	14	3	155	28105	5.62
7C	SID15715	0.012	1.129	Complexin-2	gi 5729783	P84086	Cplx2	Sortierung	E	11	1	59	15385	6.14
7C	BID622	0.039	1.084	citrate synthase	gi 13385942	Q9CZU6	Cs	KH Metabolismus	E	6	3	160	51703	9.25
7C	BID1205	0.008	1.050	esl protein	gi 20070420	Q9D172	D10Jhu81e		E	15	4	205	28073	7.64
7C	BID1723	0.023	0.932	diazepam binding inhibitor isoform 2	gi 6681137	P31786	Dbi	Lipidmetabolismus	E	32	2	111	9994	5.6
7C	BID302	0.039	0.726	eukaryotic translation initiation factor 2A	gi 26347343	Q8BJW6	Eif2a	Translation	E	2	1	57	64996	5.37
7C	SID832	0.003	1.091	enolase 2, gamma neuronal	gi 7305027	P17183	Eno2	KH Metabolismus	E	39	13	874	47267	7.71
7C	SID1324	0.002	1.095	Endoplasmic reticulum protein ERp29	gi 19526463	P57759	Erp29	Sortierung	E	25	6	357	28805	4.99

7C	BID768	0.043	0.943	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 6679937	P16858	Gapdh	KH Metabolismus	E	14	4	249	35787	9.05
7C	BID1181	0.020	1.099	Protein NipSnap2 (Glioblastoma amplified sequence)	gi 2769258	O55126	Gbas		E	23	6	382	32912	6.07
7C	SID1005	0.015	0.918	Glutaredoxin-3	gi 6840949	Q9CQM9	Glxr3	Faltung	E	29	10	599	37758	9.31
7C	BID330	0.007	0.864	MKIAA0838 protein	gi 28478945	Q69ZX9	Gls	AS Metabolismus	E	8	3	160	73916	9.36
7C	SID1058	0.006	0.898	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	P62874	Gnb1	Signaltransduktion	E	25	8	532	37353	5.58
7C	SID15240	0.000	0.904	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	P62874	Gnb1	Signaltransduktion	E	9	3	175	37353	9
7C	SID1062	0.034	0.930	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 2	gi 984551	P62880	Gnb2	Signaltransduktion	E	7	3	146	37309	5.6
7C	SID1104	0.047	0.943	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 2	gi 984551	P62880	Gnb2	Signaltransduktion	E	36	9	597	37309	5.60
7C	BID715	0.025	1.047	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 192050	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	19	8	520	47723	5.35
7C	BID723	0.007	1.054	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 192050	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	28	12	732	47723	5.12
7C	BID1139	0.022	0.775	glutathione S-transferase, mu 1	gi 6754084	P10649	Gstm1	AS Metabolismus	E	30	7	408	25953	5.56
7C	BID551	0.037	0.947	mitochondrial trifunctional	gi 21704100	Q991Y0	Hadhb	Lipidmetabolismus	E	33	16	813	51353	9.05

7C	SID15239	0.002	0.877	leucine zipper Transkription factor-like 1	gi 15277319	Q3UHL8	Lztf1		E	19	2	80	34752	9.57
7C	BID979	0.021	0.629	mitochondrial ribosomal protein L45	gi 12847837	Q9CSZ8	Mrp145	Translation	E	6	2	107	32812	8.85
7C	SID15853	0.035	0.928	Myotrophin	gi 6679961	P62774	Mtpn		E	27	2	127	12853	8.23
7C	SID15744	0.002	1.184	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	Myl6	Zytoskelett	E	31	4	277	16919	5.76
7C	SID1033	0.035	0.960	Gamma-soluble NSF attachment protein	gi 110625902	Q8C1T5	Napg	Sortierung	E	34	11	667	34710	6.36
7C	SID1433	0.022	0.823	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	gi 7657031	Q9JM14	Nt5c	Cofactor Metabolism	E	15	2	119	23062	5.03
7C	SID765	0.050	1.047	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial precursor	gi 28201978	Q8BKZ9	Pdhx	KH Metabolismus	M	27	28	86	53965	5.91
7C	SID15619	0.040	1.065	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	gi 74222953	Q3TGC5	Pebp1	Lipidmetabolismus	E	56	6	398	20876	4.56
7C	BID1840	0.002	0.885	Phosphoglycerate kinase 1	gi 129903	P09411	Pgk1	KH Metabolismus	E	43	16	909	44508	4.95
7C	BID395	0.017	0.873	pleiotropic regulator 1	gi 2832298	Q922V4	Plrg1	Translation	E	5	2	89	56928	5.62
7C	SID15297	0.021	0.837	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	gi 12835461	Q9CT86	Ppp1r2	Signaltransduktion	E	6	1	74	18817	5.52
7C	BID1274	0.030	0.900	peroxiredoxin 1	gi 6754976	P35700	Prdx1	Abbau	E	20	5	224	22162	4.92
7C	SID15634	0.021	0.901	Peroxisredoxin-2	gi 3603241	Q61171	Prdx2	Abbau	M	37	7	115	21778	8.72

7C	BID1476	0.030	0.952	peroxiredoxin 5	gi 10129957	P99029	Prdx5	Abbau	E	48	8	494	17004	9.43
7C	SID1314	0.048	0.900	Proteasome subunit alpha type 3 (Proteasome component C8) (Macropain subunit C8) (Multicatalytic en	gi 3914438	O70435	Psma3	Abbau	E	25	7	350	28387	5.06
7C	BID1213	0.046	1.088	Proteasome subunit beta type 1 [Precursor]	gi 1165123	O09061	Psb1	Abbau	E	36	7	407	24664	5.2
7C	SID15620	0.005	1.158	Proteasome subunit beta type 6 [Precursor]	gi 984938	Q60692	Psb6	Abbau	E	19	4	274	21668	5.44
7C	SID964	0.021	1.136	Transcriptional activator protein Pur-alpha	gi 34878862	P42669	Pura	Zellwachstum und -tod	E	11	4	205	34862	8.73
7C	SID15796	0.015	0.905	Parvalbumin alpha	gi 53819	P32848	Pvalb	Signaltransduktion	E	52	5	279	11937	9.08
7C	BID1828	0.009	0.908	Septin-11	gi 26324430	Q8C1B7	Sept11	Zytoskelett	E	17	6	388	49649	4.99
7C	BID625	0.028	1.054	Septin-5	gi 3986409	Q9Z2Q6	Sept5	Zytoskelett	E	10	3	154	40215	9.53
7C	BID546	0.042	1.082	Septin-7	gi 9789726	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	19	8	438	50518	7.53
7C	BID1876	0.032	1.205	Septin-7	gi 9789726	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	10	4	251	50518	5.76
7C	BID408	0.015	1.231	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	gi 12846595	Q9CY58	Serbp1	Translation	E	15	4	230	42918	4.76
7C	SID736	0.037	1.042	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1e	gi 6678087	Q00898	Serpina1e	Abbau	B	24	9	75	45862	5.91

7C	BID194	0.003	0.822	Zfp162 protein	gi 33286894	Q64213	Sfl	Transkription	M	34	14	83	59651	5.24
7C	BID414	0.001	1.169	Signal recognition particle 54 kDa protein	gi 54194	P14576	Srp54	Sortierung	E	22	9	643	55709	9.53
7C	SID15699	0.000	0.762	Stathmin	gi 9789995	P54227	Stmn1	Signaltransduktion	E	29	5	234	17264	7.55
7C	SID15700	0.029	1.040	Stathmin	gi 9789995	P54227	Stmn1	Signaltransduktion	E	26	5	233	17264	5.07
7C	BID1186	0.006	0.916	triosephosphate isomerase	gi 1864018	Q64513	Tpi1	KH Metabolismus	E	40	7	419	22492	8.44
7C	SID1395	0.001	0.930	Translationally-controlled tumor protein	gi 6678437	P63028	Tpt1	Signaltransduktion	E	33	6	307	19450	5.60
7C	SID15639	0.042	0.816	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	gi 6755929	Q00981	Uchl1	Abbau	E	17	5	245	24822	5.24
7C	BID894	0.040	0.920	Voltage-dependent anion- selective channel protein 1	gi 6755963	Q60932	Vdac1	Signaltransduktion	E	33	8	521	30737	5.42
7H	BID831	0.039	1.240	2310005E10R.ik protein	gi 20073097	Q8R318	2310005E10R.ik		E	32	3	166	13402	5.65
7H	SID1278	0.024	0.812	Actin, cytoplasmic 1	gi 49868	P60710	Actb	Zytoskelett	E	13	4	232	39161	5.78
7H	SID920	0.039	0.877	gamma-actin	gi 809561	P63260	Actg1	Zytoskelett	E	32	10	522	40992	5.56
7H	SID15200	0.004	1.120	gamma-actin	gi 809561	P63260	Actg1	Zytoskelett	E	10	3	150	40992	5.56
7H	BID1704	0.049	1.118	Acy/phosphatase-2 (Acy/phosphate phosphohydrolase 2) (Acy/phosphatase, muscle type isozyme)	gi 3023245	P56375	Acyp2	Xenobiotics	E	23	3	173	10888	8.71
7H	SID15623	0.002	0.942	adenylate kinase 1	gi 10946936	Q9R0Y5	Ak1	Nukleotidmetabolismus	E	38	10	619	23102	5.7
7H	BID654	0.023	1.061	aldolase 1, A isoform	gi 6671539	Q5FWB7	Aldoa	KH Metabolismus	E	48	15	1017	39331	8.31

7H	BID657	0.010	1.034	aldolase 1, A isoform	gi 6671539	Q5FWB7	Aldoa	KH Metabolismus	E	49	15	1021	39331	8.31
7H	BID677	0.046	0.943	aldolase 3, C isoform	gi 60687506	P05063	Aldoc	KH Metabolismus	E	39	11	684	39370	6.67
7H	SID2679	0.043	1.091	Apolipoprotein E	gi 74178217	P08226	Apoe	Lipidmetabolismus	E	26	9	515	35884	5.56
7H	BID1338	0.012	0.848	actin related protein 2/3 complex, subunit 3	gi 9790141	Q9JM76	Arpc3	Zytoskelett	E	19	3	125	20511	8.78
7H	SID2062	0.026	0.774	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 23272966	Q8CI65	Atp5b	Energiemetabolismus	E	17	6	337	56632	5.24
7H	SID772	0.021	1.059	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 23272966	P56480	Atp5b	Energiemetabolismus	E	37	15	960	56632	5.24
7H	SID15757	0.047	1.113	ATP synthase delta chain, mitochondrial [Precursor]	gi 12847456	Q9D3D9	Atp5d	Energiemetabolismus	E	17	4	236	17619	5.03
7H	SID1468	0.019	1.244	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 21313679	Q9DCX2	Atp5h	Energiemetabolismus	E	82	12	642	18738	5.52
7H	SID15883	0.008	1.080	ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial [Precursor]	gi 7949005	P97450	Atp5j	Energiemetabolismus	E	39	3	163	12489	9.36
7H	SID451	0.017	1.078	Myc box-dependent-interacting protein 1	gi 6753050	O08539	Bin1	Zellwachstum und -tod	E	8	3	181	64430	4.95
7H	SID457	0.039	1.072	Myc box-dependent-interacting protein 1	gi 6753050	O08539	Bin1	Zellwachstum und -tod	E	10	4	233	64430	4.95
7H	BID1378	0.032	0.949	cofilin 2, muscle [Musculus]	gi 6671746	P45591	Cfl2	Zytoskelett	M	ka	2	107	18698	7.66
7H	BID911	0.043	0.657	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-	gi 27754146	Q91VN4	Chchd6		E	45	11	601	29780	8.41

7H	SID807	0.010	0.878	Guanine deaminase	gi 6753960	Q9R111	Gda	Nukleotidmetabolismus	E	29	11	720	50981	5.36
7H	SID788	0.013	0.859	guanine deaminase	gi 6753960	Q9R111	Gda	Nukleotidmetabolismus	E	29	11	720	50981	5.36
7H	SID808	0.000	0.701	guanine deaminase	gi 6753960	Q9R111	Gda	Nukleotidmetabolismus	E	16	8	444	50981	5.36
7H	BID1836	0.018	0.836	glutamine synthetase	gi 31982332	P15105	Glul	AS Metabolismus	E	35	12	617	42092	6.64
7H	BID1841	0.005	0.922	glutamine synthetase	gi 31982332	P15105	Glul	AS Metabolismus	E	41	16	942	42092	6.64
7H	SID1062	0.039	0.926	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	P62874	Gnb1	Signaltransduktion	E	25	8	532	37353	5.6
7H	SID1104	0.037	0.915	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 2	gi 984551	P62880	Gnb2	Signaltransduktion	E	36	9	597	37309	5.6
7H	BID722	0.040	1.037	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 2690302	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	33	12	769	47382	9.05
7H	BID716	0.036	1.044	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 192050	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	30	14	900	47723	9.05
7H	BID723	0.041	1.059	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 192050	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	28	12	732	47723	39211
7H	BID819	0.044	0.827	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD ⁺], cytoplasmic	gi 387177	P13707	Gpd1	Lipidmetabolismus	E	6	2	97	37560	6.75
7H	BID1163	0.015	0.964	glutathione S-transferase, mu type 3	gi 13592152	P19639	Gstm3	AS Metabolismus	E	9	2	119	25664	6.84
7H	BID1675	0.002	0.814	alpha-globin	gi 193761	Q61649	Hba-a1		E	25	1	50	6212	6.82
7H	BID880	0.021	0.854	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	gi 82950644	Q9CX86	Hnrpa0	Translation	E	18	4	253	30512	9.35

7H	SID1268	0.043	0.923	Inositol monophosphatase	gi 3914098	O55023	Imp1	Signaltransduktion	E	20	5	332	30416	5.08
7H	BID775	0.006	0.693	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	gi 975314	P62482	Kcnab2		E	3	1	78	41154	9.19
7H	SID1096	0.022	0.876	lactate dehydrogenase 2, B chain	gi 6678674	P16125	Ldhb	KH Metabolismus	E	23	7	446	36549	5.7
7H	SID1107	0.041	0.932	lactate dehydrogenase 2, B chain	gi 6678674	P16125	Ldhb	KH Metabolismus	E	18	5	277	36549	5.7
7H	SID1186	0.049	0.962	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	gi 387129	P14152	Mdh1	KH Metabolismus	E	15	5	279	36454	6.16
7H	BID824	0.029	1.159	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	gi 31982186	Q8R1P0	Mdh2	KH Metabolismus	E	54	16	958	35589	8.93
7H	SID15643	0.014	1.263	39S ribosomal protein L12, mitochondrial [Precursor]	gi 12837801	Q9DBI5	Mrp12	Translation	E	30	7	348	21695	9.34
7H	SID15756	0.046	1.096	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	Myl6	Zytoskelett	E	31	5	310	16919	4.56
7H	SID15758	0.028	0.869	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	Myl6	Zytoskelett	E	31	5	299	16919	4.56
7H	SID15744	0.003	1.104	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	Myl6	Zytoskelett	E	31	4	277	16919	4.56
7H	SID15252	0.032	0.905	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	gi 41350312	Q60817	Naca	Transkription	E	12	2	163	23370	4.52
7H	SID1122	0.021	0.967	Beta-soluble NSF attachment protein	gi 29789104	P28663	Napb	Sortierung	E	40	10	678	33536	5.32
7H	BID394	0.033	0.903	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	gi 12963531	Q99K48	Nono		E	12	5	266	54564	8.86

7H	BID1141	0.019	0.868	Cleavage and polyadenylation specificity factor 5	gi 13386106	Q9CQF3	Nudt21	Translation	E	29	7	374	26224	8.85
7H	SID718	0.029	0.943	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	gi 6754974	Q61644	Pacsin1	Zytoskelett	E	43	19	1136	50544	5.15
7H	BID1180	0.038	0.883	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	gi 417489	P23506	Pemt1	Protein modification	E	9	2	130	24619	7.1
7H	SID1499	0.010	1.088	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	gi 12805431	Q99LW9	Pdhb	KH Metabolismus	E	3	1	41	34814	5.63
7H	BID1594	0.003	1.133	profilin 1	gi 6755040	P62962	Pfn1	Zytoskelett	E	34	4	210	14948	8.46
7H	BID604	0.027	0.904	Phosphoglycerate kinase 1	gi 129903	P09411	Pgk1	KH Metabolismus	E	37	14	888	44508	7.53
7H	SID1345	0.037	0.844	6-phosphogluconolactonase	gi 13384778	Q9CQ60	Pgls	KH Metabolismus	E	26	5	304	27237	5.55
7H	BID171	0.049	0.822	Phosphatase and actin regulator 1	gi 26339202	Q2M3X8	Phactr1	Zytoskelett	E	3	2	130	68184	6.69
7H	SID696	0.035	0.873	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	gi 52353955	Q61753	Phgdh	AS Metabolismus	E	15	6	427	56549	6.12
7H	BID1453	0.023	1.103	protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1	gi 12963653	Q9QUR7	Pin1	Zellwachstum und -tod	E	21	2	165	18359	8.93
7H	SID1050	0.006	0.782	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	gi 13994195	P62137	Ppp1ca	Signaltransduktion	E	7	2	106	37516	5.94
7H	SID874	0.047	0.854	Protein phosphatase 1	gi 12963569	Q3UM45	Ppp1r7	Signaltransduktion	E	28	9	559	41266	4.85

7H	BID1053	0.002	0.847	Ras suppressor protein 1 (Rsu-1) (RSP-1)	gi 548879	Q01730	Rsu1	Signaltransduktion	E	15	3	151	31531	8.86
7H	SID15880	0.041	0.910	Protein S100-A13	gi 6677835	P97352	S100a13	Signaltransduktion	E	22	2	115	11151	5.89
7H	SID15270	0.041	0.868	Protein SEC13 homolog	gi 12805321	Q9DIM0	Sec13		E	3	1	62	35501	5.15
7H	BID624	0.049	0.957	Septin-5	gi 3986409	Q9Z2Q6	Sept5	Zytoskelett	E	10	3	154	40215	6.1
7H	BID516	0.046	0.831	Septin-7	gi 28173550	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	25	11	639	50617	8.73
7H	BID523	0.021	0.789	Septin-7	gi 28173550	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	36	14	882	50617	8.73
7H	SID740	0.005	0.919	Septin-8	gi 29612695	Q8CHH9	Sept8	Zytoskelett	E	11	5	308	52647	5.96
7H	SID571	0.031	0.726	Serine protease inhibitor A3K [Precursor]	gi 541173	P07759	Serpina3k		E	3	1	76	46643	5.04
7H	SID1380	0.045	0.893	Synaptosomal-associated protein 25	gi 6755588	P60879	Snap25	Sortierung	E	50	9	539	23300	4.66
7H	SID1052	0.038	0.844	Serine racemase	gi 26389300	Q9QZX7	Srr	AS Metabolismus	E	19	4	242	36340	5.68
7H	SID15699	0.012	0.752	Stathmin	gi 9789995	P54227	Stmn1	Signaltransduktion	E	29	5	234	17264	5.76
7H	SID15259	0.037	0.915	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	gi 6755682	Q9Z1Z2	Strap	Signaltransduktion	E	43	11	707	38489	4.99
7H	BID791	0.007	1.101	Succinyl-CoA ligase [GDP- forming] subunit alpha, mitochondrial precursor	gi 9845299	Q9WUM5	Suc1g1	KH Metabolismus	E	8	2	109	34953	9.45
7H	SID15732	0.048	0.722	Small ubiquitin-related modifier 3 [Precursor]	gi 9910556	Q9Z172	Sumo3	Abbau	E	22	3	144	12422	5.67
7H	SID15315	0.013	0.911	Tropomyosin alpha-3 chain	gi 54912	P21107	Tpm3	Zytoskelett	E	37	11	668	29003	4.75

7H	SID516	0.033	0.877	Ubiquitin-1 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	gi 16307349	Q8R317	Ubqln1	Abbau	E	10	3	199	4.86	61937
7H	SID15639	0.018	0.870		gi 6755929	Q00981	Uchl1	Abbau	E	17	5	245	24822	5.33
7H	SID5639	0.019	1.089	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	19	12	721	89252	5.14
7H	SID1409	0.037	1.047	Voltage-dependent anion- selective channel protein 1	gi 6755963	Q60932	Vdac1	Signaltransduktion	E	31	6	412	30737	8.62
15C	SID15202	0.042	1.154	apolipoprotein A-IV precursor - mouse	gi 91885	Q01488	Apoa4	Lipidmetabolismus	E	15	4	274	45455	5.77
15C	SID2679	0.001	1.673	Apolipoprotein E	gi 74178217	P08226	Apoe	Lipidmetabolismus	E	26	9	515	35884	5.56
15C	SID2064	0.047	0.957	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 2623222	P56480	Atp5b	Energiemetabolismus	E	37	15	960	56632	5.24
15C	SID775	0.025	0.941	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 23272966	P56480	Atp5b	Energiemetabolismus	E	19	7	624	56632	5.24
15C	SID792	0.021	0.900	brain abundant, membrane attached signal protein 1	gi 45598372	Q91XV3	Basp1	Neuron	E	51	7	494	22074	4.5
15C	SID414	0.046	1.073	Myc box-dependent- interacting protein 1	gi 6753050	O08539	Bin1	Zellwachstum und -tod	E	10	4	233	64430	4.95
15C	BID1383	0.018	0.906	cofilin 1, non-muscle	gi 6680924	P18760	Cfl1	Zytoskelett	E	33	4	270	18548	8.22
15C	SID15778	0.002	1.052	coactosin-like 1	gi 19482160	Q9CQ16	Cotl1	Zytoskelett	E	37	10	99	15934	5.28
15C	BID1138	0.018	0.898	es1 protein	gi 20070420	Q9D172	D10hu81e		E	13	4	178	28073	9
15C	BID1723	0.010	1.080	diazepam binding inhibitor isoform 2	gi 6681137	P31786	Dbi	Lipidmetabolismus	E	32	2	77	9994	8.78

15C	SID522	0.027	0.934	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 1915913	O08553	Dpysl2	Neuron	E	57	39	228	62132	5.95
15C	BID298	0.008	0.907	dihydropyrimidinase-related protein 4	gi 34328211	O35098	Dpysl4		E	13	6	371	61922	6.51
15C	BID396	0.006	1.030	dihydropyrimidinase-related protein 4	gi 34328211	O35098	Dpysl4		E	13	6	371	61922	6.51
15C	BID1740	0.050	0.967	dynein light chain 2	gi 18087731	Q9D0M5	Dynl12	Zytoskelett	E	24	1	60	10343	6.81
15C	BID495	0.035	1.049	elongation factor Tu	gi 556301	P10126	Eef1a1	Translation	E	8	4	207	50132	9.1
15C	SID832	0.003	1.122	enolase 2, gamma neuronal	gi 7305027	P17183	Eno2	KH Metabolismus	E	20	8	439	47267	4.99
15C	SID836	0.020	1.209	enolase 2, gamma neuronal	gi 7305027	P17183	Eno2	KH Metabolismus	E	20	8	439	47267	4.99
15C	SID1324	0.030	1.069	Endoplasmic reticulum protein ERp29	gi 19526463	P57759	Erp29	Sortierung	E	25	6	357	28805	5.9
15C	SID15849	0.034	1.554	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	gi 6753810	P11404	Fabp3	Lipidmetabolismus	E	45	8	65	14810	6.11
15C	SID788	0.014	0.884	guanine deaminase	gi 6753960	Q9R111	Gda	Nukleotidmetabolismus	E	29	11	720	50981	5.36
15C	SID838	0.001	2.362	glial fibrillary acidic protein	gi 84000448	P03995	Gfap	Zytoskelett	E	49	25	1431	49870	5.27
15C	SID848	0.005	1.289	glial fibrillary acidic protein	gi 319914	P03995	Gfap	Zytoskelett	E	49	25	1431	49870	5.27
15C	SID1255	0.045	0.780	Glod4 protein	gi 12840311	Q9CPV4	Glod4	Metabolism	E	7	2	105	30765	4.8
15C	BID715	0.042	1.044	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 192050	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	19	8	520	47723	9.05
15C	BID716	0.012	1.032	mitochondrial aspartate aminotransferase	gi 192050	P05202	Got2	AS Metabolismus	E	30	14	900	47723	9.05

15C	BID922	0.004	0.675	3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	gi 1125026	Q61425	Hadh	Lipidmetabolismus	E	7	2	103	33067	7.74
15C	BID234	0.015	0.918	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (Trifunctional protein), alpha subunit	gi 33859811	Q5U5Y5	Hadha	Lipidmetabolismus	E	19	12	770	82618	9.24
15C	SID380	0.025	1.034	heat shock protein 1, beta	gi 40556608	P11499	Hsp90abl	Faltung	E	44	62	279	83229	4.97
15C	SID410	0.010	1.087	heat shock protein 1, beta	gi 40556608	P11499	Hsp90abl	Faltung	E	44	62	279	83229	4.97
15C	SID504	0.050	1.118	Heat shock-related 70 kDa protein 2	gi 109946	P17156	Hspa2		E	44	19	1134	60903	5.91
15C	SID527	0.045	1.026	Heat shock protein 8	gi 42542422	Q6NZD0	Hspa8	Faltung	E	40	20	1361	70648	5.22
15C	SID1063	0.035	0.917	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	gi 18250284	Q9D6R2	Idh3a	KH Metabolismus	E	7	3	177	39613	6.27
15C	SID1088	0.013	0.920	lactate dehydrogenase 2, B chain	gi 6678674	P16125	Ldhb	KH Metabolismus	E	28	11	697	36549	5.7
15C	SID1578	0.044	0.777	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	Myl6	Zytoskelett	E	31	5	299	16919	4.56
15C	SID15744	0.007	1.208	Myosin light polypeptide 6	gi 17986258	Q60605	Myl6	Zytoskelett	E	31	4	277	16919	4.56
15C	SID482	0.048	1.092	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	gi 21704020	Q91VD9	Ndufs1	Energiemetabolismus	E	5	3	184	79698	5.51
15C	SID1316	0.031	0.944	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB beta subunit (PAF acetylhydrolase 30 kDa	gi 3024348	Q61206	Pafah1b2	Lipidmetabolismus	E	5	2	124	25476	5.78

15C	BID1271	0.023	0.760	manganese superoxide dismutase	gi 53450	P09671	Sod2	Abbau	E	16	3	202	24662	8.8
15C	SID15266	0.007	1.117	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	gi 26344646	Q8C6F6	Strap	Signaltransduktion	E	45	36	121	38418	4.99
15C	BID278	0.012	0.905	Syntaxin-binding protein 1	gi 6981602	O08599	Stxbp1	Sortierung	E	13	8	453	67526	6.49
15C	BID285	0.029	0.920	Syntaxin-binding protein 1	gi 6981602	O08599	Stxbp1	Sortierung	E	13	8	453	67526	6.49
15C	BID292	0.021	0.905	Syntaxin-binding protein 1	gi 6981602	O08599	Stxbp1	Sortierung	E	13	8	453	67526	6.49
15C	BID201	0.019	0.871	synapsin Ib	gi 3599473	O88935	Syn1	Neuron	E	9	4	273	69992	9.84
15C	BID1168	0.035	0.959	triosephosphate isomerase	gi 1864018	P17751	Tpi1	KH Metabolismus	E	40	7	394	22492	5.62
15C	SID15276	0.015	1.292	ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	gi 13385778	Q6ZWZ2	Ube2r2	Abbau	E	22	12	56	27149	4.26
15C	BID1889	0.015	0.950	UBX domain-containing protein 1	gi 13277354	Q99PL6	Ubxdl		E	13	4	258	49765	8.7
15C	SID856	0.020	1.045	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1, mitochondrial [Precursor]	gi 14548301	Q9CZ13	Uqcr1	Energiemetabolismus	M	53	33	183	48000	9.26
15C	SID5639	0.006	1.068	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	19	12	721	89252	5.14
15C	SID843	0.002	1.674	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	29	82	104	89252	5.14
15C	SID844	0.005	1.430	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	29	82	104	89252	5.14
15H	BID1875	0.027	0.761	4-aminobutyrate	gi 37202121	P61922	Abat	AS Metabolismus	E	22	9	586	50205	8.79

15H	SID15823	0.015	0.923	Fatty acid-binding protein, heart	gi 387397	Q91W23	Fabp3	Lipidmetabolismus	E	35	4	205	14810	6.11
15H	SID838	0.004	1.517	glial fibrillary acidic protein	gi 14193690	P03995	Gfap	Zytoskelett	E	49	25	1431	49870	5.27
15H	SID15240	0.019	0.795	guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	P62874	Gnb1	Signaltransduktion	E	9	3	175	37353	5.6
15H	SID1104	0.038	0.958	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 2	gi 984551	P62880	Gnb2	Signaltransduktion	E	36	9	597	37309	5.60
15H	BID1132	0.026	0.855	glutathione S-transferase, mu 1	gi 6754084	Q58ET5	Gstm1	AS Metabolismus	E	55	13	724	25953	7.71
15H	BID922	0.029	0.453	3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	gi 1125026	Q61425	Hadh	Lipidmetabolismus	E	7	2	103	33067	7.74
15H	SID380	0.042	1.101	heat shock protein 1, beta	gi 40556608	P11499	Hsp90ab1	Faltung	E	30	16	1072	72378	5.07
15H	BID561	0.049	1.036	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic (Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase) (Oxalosuccina	gi 6647554	O88844	Idh1	KH Metabolismus	E	37	15	899	46630	6.48
15H	SID1268	0.032	0.921	Inositol monophosphatase	gi 3914098	O55023	Impa1	Signaltransduktion	E	20	5	332	30416	5.08
15H	SID1146	0.011	0.753	lactate dehydrogenase 2, B chain	gi 6678674	P16125	Ldhb	KH Metabolismus	E	28	11	697	36549	5.7
15H	SID15218	0.006	1.043	nascent polypeptide- associated complex alpha polypeptide [Mus musculus]	gi 41350312	Q60817	Naca	Transkription	E	12	2	163	23370	4.52

15H	SID15243	0.019	0.816	Gamma-soluble NSF attachment protein	gi 26355647	Q9CWZ7	Napg	Sortierung	E	34	11	667	34710	5.31
15H	BID171	0.048	0.581	Phosphatase and actin regulator 1	gi 26339202	Q2M3X8	Phactr1	Zytoskelett	E	3	2	130	68184	6.69
15H	BID1444	0.023	1.138	protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1	gi 12963653	Q9QUR7	Pin1	Zellwachstum und -tod	E	36	4	273	18359	8.93
15H	BID350	0.041	0.929	pyruvate kinase M	gi 31981562	P52480	Pkm2	KH Metabolismus	E	44	19	1215	57808	7.18
15H	BID644	0.025	0.873	Transkriptional activator protein Pur-alpha	gi 6679573	P42669	Pura	Zellwachstum und -tod	E	11	4	205	34862	6.07
15H	SID15796	0.004	0.813	Parvalbumin alpha	gi 53819	P32848	Pvalb	Signaltransduktion	E	52	5	279	11937	5.02
15H	SID763	0.034	0.936	reticulocalbin 2	gi 74146742	Q3TE95	Rcn2		E	36	9	639	41014	4.46
15H	BID674	0.045	0.915	Neuronal-specific septin-3	GI:13124538	Q9Z1S5	Sept3	Zytoskelett	E	8	4	197	52756	7.45
15H	BID678	0.028	0.919	Neuronal-specific septin-3	gi 13124538	Q9Z1S5	Sept3	Zytoskelett	E	4	2	99	52756	7.45
15H	BID631	0.022	0.917	Septin-5	gi 83305642	Q9Z2Q6	Sept5	Zytoskelett	E	26	9	474	42721	6.21
15H	BID540	0.025	0.876	Septin-7	gi 9789726	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	10	4	251	50518	8.73
15H	BID516	0.011	0.829	Septin-7	gi 28173550	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	25	11	639	50617	8.73
15H	BID523	0.007	0.833	Septin-7	gi 28173550	O55131	Sept7	Zytoskelett	E	36	14	882	50617	8.73
15H	SID791	0.006	0.868	Histone-lysine N-	gi 25091213	Q8VHL1	Setd7	AS Metabolismus	M	34	8	85	40481	4.53

15H	BID278	0.047			0.911	methyItransferase, H3 lysine-4 specific SET7 (Histone H3-K4 methyItransferase) (H3)	gi 6981602	O08599	Stxbp1	Sortierung	E	13	8	453	67526	
15H	SID939	0.024			1.116	Succinyl-CoA ligase [GDP- forming] beta-chain, mitochondrial precursor (Succinyl-CoA synthetase, bet	gi 85681897	Q9Z218	SucI2	KH Metabolismus	E	36	14	129	46811	6.58
15H	BID1186	0.013			0.904	triosephosphate isomerase	gi 1864018	Q64513	Tpi1	KH Metabolismus	E	40	7	419	5.62	
15H	BID1185	0.042			0.921	triosephosphate isomerase	gi 1864018	Q64513	Tpi1	KH Metabolismus	E	26	4	271	22492	5.62
15H	SID15315	0.007			0.919	Tropomyosin alpha-3 chain	gi 54912	P21107	Tpm3	Zytoskelett	E	37	11	668	29003	4.75
15H	SID15279	0.023			0.821	ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	gi 13385778	Q6ZWZ2	Ube2r2	Abbau	E	22	12	56	27149	4.26
15H	SID515	0.050			1.062	Ubiquitin-1	gi 16307349	Q8R317	Ubqln1	Abbau	E	10	3	199	4.86	61937
15H	SID843	0.006			1.277	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	29	82	104	89252	5.14
15H	SID844	0.010			1.244	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	gi 400712	Q01853	Vcp	Abbau	E	29	82	104	89252	5.14
15H	BID1001	0.004			1.137	Voltage-dependent anion channel 3	gi 59807690	Q5EBQ0	Vdac3	Signaltransduktion	E	31	7	472	30864	8.96
a) E: ESI-LC-MS/MS; M: MALDI-TOF-MS.																

b) Identifikation wurde wiederholt falls nur 1 Peptid gefunden wurde.								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabelle 16: Identifizierungsinformation zu den zwischen den Altersstadien Tag 9,5; Tag11,5 und Tag 13,5 unterschiedlich oder nicht unterschiedlich exprimierten Proteinen

Spot-ID	Quotient (E9.5/ E11.5)	Quotient (E11.5/ E13.5)	Quotient (E9.5/ E13.5)	p-Wert (E9.5/ E11.5)	p-Wert (E11.5/ E13.5)	p- Wert (E9.5/ E13.5)	Proteinname	gi accession	Swiss Prot Accession	Genname	MS- Tech- nik ^{a,b)}	Sequenz ab - deckung (%)	Anzahl ge- matchter Peptide ^{b)}	Mowse Score	Masse (Da)	pI
SID962	1.37	1.50	2.06	0.11	0.21	0.31	Eukaryotic initiation factor 3 subunit 2	gi 20987331	Q9QZD9	Eif3s2	E	22	8	394	36438	5.38
SID526	0.83	1.05	0.87	0.20	1.00	0.37	Alpha-internexin	gi 17390900	P46660	Ina	M	24	10	84	55000	5.35
SID527	0.63	0.54	0.34	<0.01	<0.01	0.01	Alpha-intemexin	gi 17390900	P46660	Ina	E	39	19	1113	55349	5.35
SID572	1.09	1.00	1.10	0.86	1.00	0.48	Alpha-internexin	gi 17390900	P46660	Ina	E	9	4	236	55349	5.61
BID713	0.93	0.51	0.48	1.00	<0.01	<0.01	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial [Precursor]	gi 21450129	Q8QZT1	Acat1	E	10	3	249	44787	8.71
BID177	0.72	0.82	0.59	0.08	0.23	<0.01	Aconitate hydratase, mitochondrial [Precursor]	gi 18079339	Q99KI0	Aco2	E	15	11	595	85410	8.08
SID826	1.17	0.94	1.10	0.25	1.00	0.06	Actin, cytoplasmic 2	gi 809561	P63260	Actg1	E	5	2	113	41754	5.23
SID837	0.86	0.74	0.64	1.00	0.33	<0.01	Actin, cytoplasmic 2	gi 809561	P63260	Actg1	E	23	8	502	40992	5.56
SID902	0.84	0.84	0.71	1.00	0.91	0.01	Actin, cytoplasmic 2	gi 49868	P63260	Actg1	M	28	6	64	39000	5.78
SID731	1.30	1.45	1.88	0.08	0.10	0.68	Actin-like protein 6A	gi 9789893	Q9Z2N8	Actl6a	E	13	6	357	47399	5.39
BID1137	0.76	0.93	0.71	1.00	1.00	0.95	GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	gi 4760600	Q9WTP7	Ak3	E	43	9	508	24625	8.57
SID382	0.19	0.59	0.11	0.01	0.04	0.39	Serum albumin [Precursor]	gi 19353306	P07724	Alb	E	19	13	570	68648	5.75

BID706	1.94	1.56	3.04	<0.01	0.14	0.00	Aldolase I, A isoform	gi 6671539	Q6NY00	Alcoa	E	40	18	1057	39331	8.31
SID1427	0.61	0.79	0.49	0.02	0.21	1.00	apolipoprotein A-I precursor - mouse	gi 74146433	Q8BPD5	Apoa1	E	20	6	335	30597	5.52
SID1434	0.42	0.34	0.14	<0.01	<0.01	0.32	Apolipoprotein [Precursor]	gi 15126646	Q00623	Apoa1	E	32	10	520	30597	5.51
SID1618	0.75	1.01	0.76	0.01	1.00	<0.01	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	gi 37805157	Q9CPW4	Arpc5	E	23	3	151	16278	5.47
SID669	0.92	0.97	0.89	0.69	1.00	0.90	Atp5b protein [Fragment]	gi 23272966	Q8CI65	Atp5b	M	49	26	209	57000	5.24
SID688	0.95	0.82	0.79	1.00	0.84	1.00	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Precursor]	gi 31980648	P56480	Atp5b	M	46	25	172	56000	5.19
SID1440	0.75	1.10	0.82	<0.01	0.82	0.30	ATP synthase D chain, mitochondrial	gi 51980458	Q9DCX2	Atp5h	M	68	12	129	19000	5.52
SID637	1.08	1.04	1.13	1.00	1.00	0.58	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	gi 19705578	P62814	Atp6v1b2	E	2	1	48	56515	5.57
SID695	0.47	0.82	0.38	<0.01	0.29	1.00	brain abundant, membrane attached signal protein 1 [Mus musculus]	gi 45598372	Q9BWA5	Baspl	E	28	4	191	22074	4.5
BID693	1.43	1.00	1.43	0.24	1.00	0.36	Mitotic checkpoint protein BUB3	gi 31560618	Q9WVA3	Bub3	E	29	10	580	36931	6.36
SID436	0.85	0.94	0.80	1.00	1.00	<0.01	Calreticulin [Precursor]	gi 6680836	P14211	Calr	E	10	4	160	47965	4.33
SID3201	0.41	0.61	0.25	0.18	0.16	<0.01	Calumenin [Precursor]	gi 5915871	O35887	Calu	E	103	1	20	37041	4.49
BID1858	0.45	0.59	0.27	0.01	<0.01	<0.01	Carbonyl reductase 1	gi 113680352	Q91X28	Cbr1	E	24	4	199	30622	8.53
SID1433	0.90	1.27	1.14	0.21	<0.01	1.00	Chromobox homolog 1	gi 5803076	P83917	Cbx1	M	48	14	137	21000	4.85

SID1534	0.89	1.25	1.11	0.44	0.06	1.00	chromobox homolog 3 (Drosophila HPI gamma),	gj 6680860	Q9DCC5	Cbx3	M	45	10	80	20000	4.96
BID1464	1.37	1.41	1.93	0.74	1.00	0.25	Coiled-coil domain- containing protein 58	gj 38348528	Q8R3Q6	Ccdc58	E	35	4	283	16655	8.35
BID351	1.46	1.06	1.54	0.13	1.00	0.15	T-complex protein 1 subunit zeta	gj 6753324	P80317	Cct6a	E	14	5	347	57968	6.63
BID467	1.12	0.84	0.94	1.00	0.64	1.00	T-complex protein 1 subunit eta	gj 549060	P80313	Cct7	E	8	4	192	59614	7.95
SID1160	0.97	1.51	1.47	1.00	<0.01	1.00	Carnitine deficiency- associated protein CDV3A	gj 28202071	Q92014	Cdv3	M	35	7	85	24324	5.7
SID1077	1.61	0.76	1.23	0.09	0.78	1.00	Carnitine deficiency- associated gene expressed in ventricle 3	gj 38328181	Q4VAA2	Cdv3	M	4	1	54	29008	5.83
BID1379	1.44	1.61	2.31	0.87	1.00	0.28	Cofilin-2	gj 6671746	P45591	Cfl2	E	23	3	167	18698	7.66
BID1854	1.02	0.99	1.01	1.00	1.00	1.00	Coiled-coil-helix-coiled- coil-helix domain- containing protein 6	gj 27754146	Q91VN4	Chchd6	E	19	4	294	29780	8.41
BID1385	0.19	0.36	0.07	<0.01	<0.01	<0.01	Cold-inducible RNA- binding protein	gj 6680946	P60824	Cirbp	E	12	2	132	18596	9.61
SID518	0.93	1.16	1.09	1.00	0.85	<0.01	Cardiotrophin-like cytokine factor 1 [Precursor]	gj 9910314	Q9QZM3	Clefl	E	3	1	36	25245	8.7
SID1252	0.70	0.88	0.62	0.20	1.00	0.28	CHLORIDE INTRACELLULAR CHANNEL PROTEIN 1 (NUCLEAR CHLORIDE ION CHANNEL 27)	gj 15617203	Q542F1	Clic1	M	48	10	100	27000	5.09

SID1242	0.33	0.89	0.29	<0.01	0.60	0.22	NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	gj 13097102	Q99LD8	Ddah2	M	37	8	88	30000	5.66
BID337	1.09	0.80	0.87	1.00	0.28	0.91	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	gj 2500527	Q61656	Ddx5	E	10	6	345	69277	9.06
BID908	0.64	0.73	0.47	0.34	0.38	0.03	Dehydrogenase/reductase SDR family member 1	gj 31980844	Q99L04	Dhrs1	E	12	3	209	33983	8.66
BID1145	1.39	1.09	1.51	0.59	1.00	0.52	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	gj 13097510	Q99LB2	Dhrs4	E	6	2	138	27737	9.23
SID466	1.08	0.61	0.66	1.00	0.02	0.57	Dihydrolipoamide S-acyltransferase	gj 31542559	Q8R339	Dlat	E	43	1	173	67903	8.81
BID423	0.88	0.81	0.72	1.00	0.26	0.07	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	gj 2078522	O08749	Dld	E	13	7	360	54178	7.97
BID490	2.20	0.79	1.73	0.11	1.00	0.44	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	gj 2078522	O08749	Dld	E	2	1	63	54178	7.97
SID666	0.82	1.13	0.93	0.07	0.43	0.11	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial [Precursor]	gj 21313536	Q9D2G2	Dlst	E	7	4	174	48964	9.11
BID2442	1.07	1.11	1.19	1.00	1.00	0.97	DnaJ homolog subfamily C member 8	gj 34784000	Q6NZB0	Dnajc8	E	20	5	245	29663	9.05
SID2789	0.60	0.65	0.39	<0.01	<0.01	0.47	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gj 40254595	O08553	Dpysl2	M	37	16	135	62239	5.95

SID415	0.46	0.42	0.19	<0.01	<0.01	0.01	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 40254595	O08553	Dpysl2	M	55	25	243	62000	5.95
SID457	0.75	0.57	0.43	0.12	<0.01	<0.01	Dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 40254595	O08553	Dpysl2	M	25	11	21	62239	5.95
SID486	0.08	0.25	0.02	<0.01	<0.01	1.00	Dihydropyrimidinase-related protein 3	gi 6681219	Q62188	Dpysl3	E	8	3	149	61897	6.04
SID523	0.96	0.98	0.94	1.00	1.00	0.21	Dihydropyrimidinase-related protein 3	gi 6681219	Q62188	Dpysl3	E	2	1	50	61897	6.04
SID334	1.79	0.92	1.66	0.02	1.00	1.00	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	gi 6753658	O88487	Dync li2	E	7	5	258	68352	5.16
BID1114	0.86	0.93	0.79	0.43	1.00	0.16	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial [Precursor]	gi 12805413	Q8BH95	Echs1	E	22	7	400	31237	8.76
BID2463	1.08	0.89	0.97	1.00	1.00	1.00	Elongation factor 1-alpha 1	gi 50797	P10126	Eef1a1	E	11	5	264	50140	9.04
SID1213	1.64	1.51	2.48	0.01	0.24	0.06	Elongation factor 1-beta	gi 5902663	O70251	Eef1b	M	40	9	89	25000	4.47
SID1217	2.05	1.61	3.30	<0.01	0.18	0.49	Elongation factor 1-beta	gi 5902663	O70251	Eef1b	M	19	5	85	25000	4.47
SID1069	1.49	1.43	2.14	<0.01	0.08	<0.01	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	gi 12856949	Q80T06	Eef1d	M	4	1	47	28710	4.91
SID1070	1.40	1.47	2.05	0.02	0.11	0.05	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	gi 54287684	Q80T06	Eef1d	M	58	17	173	31000	4.96
SID1126	1.33	1.49	1.99	0.06	0.08	0.94	Elongation factor 1-delta	gi 12856949	P57776	Eef1d	M	19	6	63	28710	4.91

BID1575	0.70	1.17	0.82	0.16	1.00	1.00	Eukaryotic initiation factor 1	translation	gj 927435	P48024	Eif1	E	26	2	153	12668	6.04
SID1628	1.33	1.47	1.97	0.16	0.13	1.00	Eukaryotic initiation factor 5A isoform I variant AE		gj 54673799	Q78NR3	Eif5a	M	67	14	142	17000	5.08
BID2222	1.01	1.02	1.03	1.00	1.00	1.00	ELAV (Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1		gj 31542602	Q91YP5	Elavl1	E	12	4	218	36146	9.12
BID2224	0.91	0.85	0.77	1.00	0.35	0.10	ELAV-like protein 1		gj 13124196	P70372	Elavl1	E	14	5	253	36046	9.23
BID1264	0.83	1.29	1.06	0.51	0.30	1.00	Alpha-enolase		gj 12963491	P17182	Eno1	E	8	3	164	47095	6.37
BID2329	1.38	1.20	1.66	0.10	1.00	0.03	Alpha-enolase		gj 12963491	P17182	Eno1	E	16	6	340	47095	6.37
BID709	0.42	1.06	0.44	0.12	1.00	0.30	Alpha-enolase		gj 12963491	P17182	Eno1	E	22	8	538	50209	8.01
BID2280	1.83	0.92	1.68	0.05	1.00	0.18	Beta-enolase		gj 6679651	P21550	Eno3	E	28	13	805	46995	6.73
SID1302	0.77	0.85	0.65	<0.01	0.04	1.00	Endoplasmic reticulum protein ERp29 [Precursor]		gj 19526463	P57759	Erp29	M	42	13	164	29000	5.9
BID964	1.54	1.11	1.70	0.02	1.00	0.02	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide		gj 66911229	Q4V9X5	Etfa	E	14	3	186	34988	8.62
BID968	0.64	1.31	0.83	0.24	0.82	1.00	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial [Precursor]		gj 13097375	Q99LC5	Etfa	E	28	8	428	35018	8.62
BID1127	1.03	0.71	0.73	1.00	0.26	0.43	Electron transfer flavoprotein subunit beta		gj 38142460	Q9DCW4	Etfb	E	18	4	268	27606	8.24
BID134	0.94	0.84	0.79	1.00	0.34	0.17	RNA-binding protein EWS		gj 2500583	Q61545	Ewsr1	E	4	2	102	68376	9.37
BID155	0.77	0.86	0.66	0.73	1.00	0.26	RNA-binding protein EWS		gj 6679715	Q61545	Ewsr1	E	8	2	86	68376	9.37

SID3912	0.14	0.55	0.08	<0.01	0.01	0.57	Fatty acid-binding protein, heart	gi 6753810	P11404	Fabp3	E	24	3	150	14810	6.11
SID1786	0.12	0.54	0.06	<0.01	<0.01	0.38	fatty acid binding protein 7, brain	gi 56709486	Q5NDA4	Fabp7	E	17	2	98	14884	5.06
BID1560	0.37	0.55	0.20	0.10	0.04	<0.01	FK506-binding protein 2 [Precursor]	gi 6679805	P45878	Fkbp2	E	19	2	116	15334	9.05
BID489	1.10	0.79	0.87	1.00	1.00	1.00	Fascin	gi 113680348	Q61553	Fsen1	E	33	14	846	54474	6.44
BID501	0.60	0.94	0.56	0.55	1.00	0.55	Fscn1 protein [Fragment]	GI:144719132	Q80V75	Fsen1	E	14	5	308	51373	6.57
BID267	0.55	7.85	4.31	0.53	0.06	0.80	Far upstream element-binding protein 1	gi 84662730	Q91WJ8	Fubp1	E	16	8	423	67401	7.18
BID268	0.67	1.36	0.91	0.45	0.82	1.00	Far upstream element-binding protein 1	gi 37078458	Q91WJ8	Fubp1	E	11	6	367	68497	7.74
SID803	0.98	0.83	0.82	1.00	0.54	<0.01	Neuromodulin	gi 20271449	P06837	Gap43	E	43	7	384	23618	4.63
BID2362	0.53	1.23	0.66	0.16	1.00	0.88	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 6679937	P16858	Gapdh	E	8	2	140	35787	8.44
BID817	1.05	1.10	1.16	1.00	0.53	0.18	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 6679937	P16858	Gapdh	E	39	10	702	35787	8.44
BID845	1.18	1.15	1.35	0.52	1.00	0.14	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 50233866	Q569X5	Gapdh	E	17	6	315	35787	8.44
SID3170	0.80	1.05	0.84	0.05	1.00	0.06	Lactoylglutathione lyase		Q9CPU0	Glo1	E	3	1	37	20826	5.24
BID494	1.14	1.01	1.15	1.00	1.00	1.00	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial [Precursor]	gi 6680027	P26443	Glud1	E	11	4	233	61298	8.05
BID975	1.84	0.99	1.82	0.02	1.00	0.05	guanine nucleotide binding protein, beta 2	gi 74204616	Q3TW88	Gnb2l1	E	35	11	724	35039	7.6

BID1039	0.84	1.17	0.98	0.47	0.70	1.00	Glutathione omega-1	transferase	gj 6754090	O09131	Gsto1	E	13	3	139	27480	6.92
BID1219	0.81	0.91	0.73	0.02	0.43	<0.01	Glutathione 1	S-transferase P	gj 2624496	P19157	Gstp1	E	27	5	336	23350	8.13
BID943	0.77	1.06	0.81	<0.01	1.00	0.06	Hydroxyacyl-coenzyme dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	A	gj 1125026	Q61425	Hadh	E	20	7	358	33067	7.74
BID1166	0.84	1.10	0.92	0.39	1.00	1.00	hydroxysteroid dehydrogenase 10	(17-beta)	gj 12850643	Q9CYT3	Hadh2	E	8	2	83	27257	9.1
BID2470	0.66	0.93	0.62	<0.01	1.00	<0.01	hydroxyacyl-Coenzyme dehydrogenase/3-ketoacyl- Coenzyme A thiolase/enoyl- Coenzyme A hydratase (trifunctional protein),	A	gj 21704100	Q3TCY3	Hadha	E	12	6	347	51353	9.43
BID1578	0.53	1.24	0.66	0.31	1.00	1.00	Hemoglobin subunit zeta		gj 309259	P06467	Hbz	E	45	6	318	16205	7.05
BID1745	0.25	0.90	0.22	<0.01	1.00	<0.01	Hemoglobin subunit zeta		gj 193802	P06467	Hbz	E	21	2	120	11182	7.23
BID798	0.88	0.77	0.68	1.00	0.69	0.37	3-hydroxyisobutyryl- Coenzyme A hydrolase		gj 22122625	Q8QZS1	Hibch	E	2	1	44	43010	8.16
BID1737	0.93	1.06	0.98	1.00	1.00	1.00	Histidine triad nucleotide- binding protein 1		gj 33468857	P70349	Hint1	E	24	4	221	13768	6.36
BID1087	0.81	1.60	1.29	1.00	0.43	1.00	Histone H1.2		gj 9845257	P15864	Hist1h1c	E	15	3	157	22132	10.95
SID613	0.72	1.59	1.14	0.01	<0.01	0.78	Hydroxymethylglutaryl- CoA synthase, cytoplasmic		gj 20988709	Q8JZK9	Hmgcs1	M	45	25	179	58000	5.65
BID2216	1.05	1.10	1.16	1.00	0.56	0.18	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1		gj 85060507	P49312	Hnrpa1	E	34	10	661	38810	9.17

BID663	1.13	1.21	1.38	0.05	0.01	<0.01	Heterogeneous ribonucleoprotein A1	nuclear	gj 4504445	P49312	Hnrpa1	E	31	9	650	34175	9.17
BID708	0.87	1.05	0.92	0.08	1.00	0.67	Heterogeneous ribonucleoprotein A1	nuclear	gj 85060507	P49312	Hnrpa1	E	40	12	698	38810	9.17
BID1000	0.84	1.09	0.92	0.56	1.00	1.00	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	GI:124028629	O88569	Hnrpa2b1	E	48	14	976	35971	8.67
BID791	0.87	1.03	0.89	0.01	1.00	0.06	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	gj 23266713	O88569	Hnrpa2b1	E	48	13	859	37380	8.97
BID866	0.73	0.78	0.56	0.01	0.01	<0.01	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	GI:124028629	O88569	Hnrpa2b1	E	42	11	789	35971	6.87
BID867	0.75	0.95	0.72	<0.01	1.00	<0.01	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	gj 23266713	O88569	Hnrpa2b1	E	56	18	1083	35971	8.67
BID874	1.08	0.94	1.02	1.00	1.00	1.00	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	GI:124028629	O88569	Hnrpa2b1	E	39	10	606	35971	8.67
BID879	1.37	0.93	1.27	0.34	1.00	0.81	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	GI:124028629	O88569	Hnrpa2b1	E	42	11	802	35971	8.67
BID977	0.79	1.18	0.93	<0.01	<0.01	0.44	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	GI:124028629	O88569	Hnrpa2b1	E	39	12	819	35971	8.67
BID688	0.74	0.74	0.55	0.01	<0.01	<0.01	Heterogeneous ribonucleoprotein A3	nuclear	gj 23274114	Q8BG05	Hnrpa3	E	14	4	210	37063	8.46
BID716	1.06	0.98	1.03	1.00	1.00	1.00	Hnrpa3 protein		gj 82918357	Q0VG47	Hnrpa3	E	28	7	461	32406	8.5
BID724	0.88	0.86	0.76	1.00	0.73	0.21	Heterogeneous ribonucleoprotein A3	nuclear	gj 23274114	Q8BG05	Hnrpa3	E	14	4	210	37063	8.46
BID797	0.93	1.07	0.99	1.00	1.00	1.00	Heterogeneous	nuclear	gj 25991929	Q8BG05	Hnrpa3	E	14	3	251	37063	8.46

SID1054	1.25	1.08	1.34	1.00	1.00	1.00	Heat shock 70 kDa protein 4	gj 1661134	Q61316	Hspa4	E	4	4	156	70793	5.37
SID200	1.48	1.31	1.93	<0.01	0.42	0.01	Heat shock 70 kDa protein 4	gj 2495342	Q61316	Hspa4	E	18	14	742	94073	5.15
SID201	1.41	1.50	2.12	0.08	0.25	0.03	Heat shock protein 4	gj 13277753	Q99L75	Hspa4	E	15	11	628	94021	5.13
SID3997	1.36	1.13	1.54	<0.01	0.89	0.18	Heat shock protein 4	gj 31982275	Q5NCS5	Hspa4	M	56	48	410	94000	5.13
SID2762	0.40	0.91	0.37	0.05	1.00	0.01	Heat shock 70 kDa protein 4L	gj 705391	P48722	Hspa4l	E	4	3	136	94430	5.53
SID375	0.95	0.97	0.92	0.85	1.00	0.03	78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]	gj 74207401	P20029	Hspa5	E	30	17	970	72377	5.07
SID384	1.11	1.09	1.20	0.59	0.58	0.52	78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]	gj 74207401	P20029	Hspa5	E	50	29	1659	72378	5.07
SID438	1.20	1.20	1.44	0.05	0.13	<0.01	Heat shock cognate 71 kDa protein	gj 31981690	P63017	Hspa8	E	22	15	802	70827	5.37
SID571	1.35	1.62	2.18	<0.01	<0.01	1.00	heat shock protein, 60 kDa	gj 31981679	Q8C2C7	Hspd1	M	41	27	239	61000	5.67
SID576	0.82	1.01	0.83	<0.01	0.12	0.99	heat shock protein, 60 kDa	gj 31981679	Q8C2C7	Hspd1	M	35	20	212	61000	5.67
SID619	1.13	1.29	1.45	0.58	0.12	0.01	60 kDa heat shock protein, mitochondrial [Precursor]	gj 51452	P63038	Hspd1	E	8	4	219	58833	5.48
SID654	2.08	1.62	3.37	0.01	0.69	1.00	heat shock protein, 60 kDa	gj 51452	Q8C2C7	Hspd1	E	3	2	106	58833	5.48
SID887	0.74	1.21	0.89	0.44	1.00	0.01	60 kDa heat shock protein, mitochondrial [Precursor]	gj 51452	P63038	Hspd1	E	6	3	175	60903	5.91
SID3970	1.35	1.20	1.62	0.01	0.31	0.01	170 kDa glucose regulated protein GRP170 [Precursor]	gj 7643979	Q9JKR6	Hyou1	E	11	9	533	111112	5.12
SID3971	1.07	1.17	1.25	0.99	0.22	<0.01	170 kDa glucose regulated protein GRP170 [Precursor]	gj 7643979	Q9JKR6	Hyou1	E	7	5	348	111112	5.12

BID629	0.65	0.67	0.44	0.04	<0.01	<0.01	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	gi 6647554	O88844	Idh1	E	30	13	667	46630	6.48
SID963	1.60	1.10	1.76	<0.01	1.00	0.12	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial [Precursor]		Q9D6R2	Idh3a	M	33	8	73	31000	5.7
BID294	1.17	1.45	1.70	0.13	0.01	<0.01	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	gi 6753518	O88477	Igf2bp1	E	42	21	1186	63411	9.26
BID297	0.87	1.35	1.18	0.24	0.01	0.36	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	gi 6753518	O88477	Igf2bp1	E	21	10	588	63411	9.26
BID330	0.94	1.05	0.98	1.00	1.00	1.00	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	gi 74215286	Q5SF07	Igf2bp2	E	4	2	107	65543	7.81
BID264	1.07	1.16	1.24	1.00	0.30	0.09	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	gi 11933384	Q9CPN8	Igf2bp3	E	10	5	309	63535	8.99
SID3143	1.27	0.87	1.10	0.90	1.00	<0.01	Inositol monophosphatase	gi 3914098	O55023	Impa1	E	21	5	257	30416	5.08
BID2353	0.53	0.89	0.47	0.21	1.00	0.14	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	gi 9789985	Q9JHI5	Ivd	E	12	5	294	46296	8.53
BID799	0.94	1.20	1.13	1.00	1.00	1.00	LIM and SH3 domain protein 1	gi 1407651	Q61792	Lasp1	E	46	10	611	23087	5.11
BID902	1.76	1.23	2.17	0.02	1.00	0.01	L-lactate dehydrogenase A chain	gi 6754524	P06151	Ldha	E	24	8	424	36475	8.55
SID1779	0.24	0.46	0.11	<0.01	<0.01	0.65	Galectin-1	gi 12805209	P16045	Lgals1	M	46	8	72	15000	5.32
BID1255	0.83	1.17	0.97	0.90	1.00	1.00	Lin-7 homolog C	gi 8922944	O88952	Lin7c	E	19	3	175	21820	8.52
SID449	0.95	0.98	0.93	1.00	1.00	0.83	Lamin-B1	gi 6754556	P14733	Lmnb1	E	9	6	303	66719	5.14

BID1172	0.94	1.42	1.33	1.00	0.32	0.70	DNA segment, Chr 5, Brigham and Women's Genetics 0676 expressed	gj 22748747	Q9D0R8	Lsm12	E	6	2	63	21687	7.63
SID1524	0.82	0.94	0.77	1.00	1.00	0.73	Leucine zipper and CTNNBIP1 domain containing		A2A7N9	Lzic	E	5	1	39	21523	4.9
SID254	0.67	0.10	0.07	1.00	0.38	1.00	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	gj 6678768	P26645	Marcks	E	15	3	133	29644	4.34
SID265	0.67	0.97	0.65	0.55	1.00	0.20	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	gj 6678768	P26645	Marcks	E	21	3	148	29644	4.34
SID270	1.59	2.02	3.20	<0.01	<0.01	0.97	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	gj 6678768	P26645	Marcks	E	30	4	205	29644	4.34
SID306	0.41	1.13	0.46	0.08	1.00	0.89	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	gj 6678768	P26645	Marcks	E	16	2	102	29644	4.34
SID319	0.45	1.67	0.75	0.15	0.50	<0.01	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	gj 6678768	P26645	Marcks	E	11	2	278	29644	4.34
SID322	0.50	1.11	0.56	0.24	1.00	0.01	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	gj 6678768	P26645	Marcks	E	15	2	123	29644	4.34
BID2327	1.45	1.29	1.86	0.20	1.00	0.06	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-2	gj 21704144	Q3THS6	Mat2a	E	13	5	322	43661	6.02
BID830	0.94	0.92	0.86	1.00	1.00	1.00	DTDP-4-KETO-6-DEOXY-4-D-GLUCOSE REDUCTASE homolog	gj 26344854	Q8BVX6	Mat2b	E	17	5	299	36187	6.14
BID424	0.87	0.79	0.68	1.00	0.72	0.34	Mccc2 protein	gj 73622267	Q8K1L7	Mccc2	E	7	3	178	61340	8.2
BID1622	3.27	2.21	7.22	0.01	1.00	<0.01	Macrophage migration	gj 191491	P34884	Mif	E	14	2	98	11877	6.97

SID1301	0.75	0.91	0.68	<0.01	0.21	0.06	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha2 subunit	gj 51859418	Q6PKE6	Pafah1b2	M	25	6	76	26000	5.57
BID612	0.85	1.29	1.10	1.00	1.00	1.00	Poly(rC)-binding protein 4	gj 12230430	P57724	Pcbp4	E	17	6	327	41373	8.62
BID636	0.99	1.94	1.93	1.00	0.12	0.18	Poly(rC)-binding protein 4	gj 12230430	P57724	Pcbp4	E	10	3	171	41373	8.62
BID1076	0.94	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00	Protein-L-isoaspartate(D- aspartate) O- methyltransferase	gj 417489	P23506	Pcmt1	E	9	3	114	24619	7.1
BID1175	1.22	1.11	1.36	1.00	1.00	0.84	Protein-L-isoaspartate(D- aspartate) O- methyltransferase	gj 6679217	P23506	Pcmt1	E	26	6	306	24607	7.1
BID1184	2.02	1.11	2.23	0.09	1.00	0.11	Protein-L-isoaspartate(D- aspartate) O- methyltransferase	gj 6679217	P23506	Pcmt1	E	26	6	306	24607	7.1
BID1110	1.17	1.36	1.58	1.00	0.48	0.12	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	gj 77415381	Q3UHX2	Pdap1	E	8	1	91	20461	7.3
BID293	1.00	0.84	0.84	1.00	1.00	1.00	Programmed cell death 8	gj 6755004	A2ACN1	Pdcd8	E	6	3	186	66724	9.23
SID662	2.11	0.43	0.90	0.06	0.03	<0.01	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	gj 130232	P27773	Pdia3	E	13	6	293	56586	5.98
BID1544	3.41	0.94	3.20	0.10	1.00	0.20	Profilin-1	gj 6755040	P62962	Pfn1	E	8	1	63	14948	8.46
BID1547	0.98	1.11	1.09	1.00	0.47	0.94	Profilin-1	gj 6755040	P62962	Pfn1	E	40	4	257	14948	8.46
BID667	1.20	1.15	1.38	0.33	0.89	0.07	Phosphoglycerate kinase 1	gj 70778976	P09411	Pgk1	E	41	16	882	44522	7.53
SID1316	0.65	1.21	0.78	<0.01	0.23	1.00	6-phosphogluconolactonase	gj 13384778	Q9CQ60	Pgls	M	34	8	100	27000	5.55
SID1253	1.06	1.15	1.21	1.00	0.42	1.00	Prohibitin	gj 54035592	P67778	Phb	M	55	16	190	30000	5.57

SID577	1.25	1.07	1.34	0.01	1.00	0.01	3-phosphoglycerate dehydrogenase	gi 26345686	Q8C603	Phgdh	E	28	12	735	56546	6.29
BID1419	0.71	1.28	0.91	0.11	0.37	1.00	Peptidyl-prolyl isomerase A	gi 6679439	P17742	Ppia	E	21	3	164	17960	7.74
BID1453	0.74	1.18	0.87	<0.01	0.14	0.56	Peptidyl-prolyl isomerase A	gi 6679439	P17742	Ppia	E	12	2	94	17960	7.74
BID1408	0.94	1.02	0.96	1.00	1.00	1.00	Peptidyl-prolyl isomerase-like 1	gi 21312784	Q9D0W5	Ppil1	E	12	2	123	18225	7.78
SID1483	0.69	0.95	0.66	<0.01	1.00	0.14	Prdx2 protein	gi 3603241	Q61171	Prdx2	E	12	3	132	21792	5.2
SID1495	0.65	0.97	0.62	0.02	1.00	0.24	Prdx2 protein	gi 3603241	Q61171	Prdx2	E	14	3	147	21778	5.2
SID1271	0.98	0.98	0.96	1.00	1.00	1.00	Proteasome subunit alpha type 3	gi 31981534	O70435	Psma3	E	8	2	95	28472	5.4
BID1249	0.95	0.98	0.93	1.00	1.00	0.83	Proteasome subunit beta type 5 precursor	gi 3914434	O55234	Psmb5	E	48	12	749	22952	8.65
SID768	1.07	1.24	1.33	0.68	0.02	1.00	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	gi 13543237	Q99JN8	Psmc3	E	46	20	1178	49518	5.09
SID742	1.13	1.13	1.27	0.42	0.61	1.00	26S protease regulatory subunit 6B	gi 10697240	P54775	Psmc4	E	28	14	747	47379	5.18
SID643	0.82	1.16	0.94	0.02	0.16	1.00	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	gi 6679505	O35226	Psmc4	E	36	13	848	40678	4.67
BID480	1.20	1.07	1.27	<0.01	0.70	<0.01	Polypyrimidine tract binding protein 1	gi 20809354	Q8K144	Ptbp1	E	10	5	280	59251	9.21
BID483	1.08	1.03	1.11	0.68	1.00	0.49	Ptbp1 protein	gi 13879378	Q923A7	Ptbp1	E	12	1	36	16747	8.93

BID1234	1.17	1.20	1.40	1.00	1.00	0.68	Peptidyl-rRNA hydrolase 2, mitochondrial [Precursor]	gj 33239415	Q8R2Y8	Pthr2	E	9	1	102	19645	6.96
SID1337	0.93	1.53	1.42	0.30	<0.01	<0.01	Ran-specific GTPase-activating protein	gj 739241	P34022	Ranbp1	M	17	4	207	23568	5.15
SID697	1.50	1.43	2.14	0.02	0.32	1.00	Histone-binding protein RBBP7	gj 2494892	Q60973	Rbbp7	E	20	8	345	47760	4.89
BID206	0.90	0.82	0.74	1.00	0.34	0.11	RNA-binding protein 14	gj 86262142	Q8C2Q3	Rbm14	E	12	8	471	69406	9.68
SID1698	1.17	1.72	2.00	0.28	<0.01	0.37	60S acidic ribosomal protein P2	gj 74140891	P99027	Rplp2	M	53	3	169	4.42	11644
BID1644	1.05	1.52	1.59	1.00	<0.01	<0.01	40S ribosomal protein S21	gj 21536222	Q9CQR2	Rps21	E	30	3	212	9136	8.71
SID2492	1.90	1.67	3.18	<0.01	0.91	1.00	40S ribosomal protein SA	gj 125970	P14206	Rpsa	E	16	4	218	32698	4.74
SID819	1.29	1.47	1.90	0.01	<0.01	<0.01	40S ribosomal protein SA	gj 226005	P14206	Rpsa	E	25	7	484	32732	4.8
BID1865	0.79	0.82	0.65	0.10	0.13	<0.01	Ras suppressor protein 1	gj 548879	Q01730	Rsu1	E	32	10	443	31531	8.86
BID2271	1.17	1.14	1.33	1.00	1.00	0.58	Multisynthetase complex auxiliary component p43	GI:126012517	P31230	Scye1	E	29	6	418	33976	8.57
SID869	0.88	0.97	0.86	0.56	1.00	0.09	Selenide, water dikinase 1 (Doppelspot)	gj 26336959	Q8BH69	Sephs1	E	11	4	200	42879	5.64
BID727	1.06	0.93	0.98	1.00	1.00	1.00	Septin-9	gj 49022852	Q80UG5	Sept9	E	4	3	154	67811	8.31
BID445	1.01	1.37	1.38	1.00	0.01	0.02	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	gj 52783213	Q9CY58	Serbp1	E	9	3	158	42210	8.42
BID622	0.82	0.73	0.60	0.02	<0.01	<0.01	Serpinh1 protein	gj 6753304	Q5U4D0	Serpinh1	E	36	16	949	46560	8.9
SID1787	0.14	0.58	0.08	0.09	0.24	<0.01	SH3 domain-binding	gj 9506971	Q9JUU8	Sh3bgrl	E	44	4	219	12803	4.87

SID1631	0.69	0.49	0.34	0.55	<0.01	1.00	Stathmin	gi 9789995	Q545B6	Stmn1	E	26	4	186	17264	5.76
SID1632	0.57	0.65	0.37	<0.01	<0.01	<0.01	Stathmin	gi 14625464	Q545B6	Stmn1	E	41	10	88	17000	5.95
SID1639	1.77	1.34	2.37	0.04	1.00	0.93	Stathmin	gi 9789995	Q545B6	Stmn1	E	26	4	203	17264	5.76
SID1644	0.50	0.81	0.41	<0.01	0.04	0.06	Stathmin	gi 14625464	Q545B6	Stmn1	E	48	10	92	17000	5.95
SID1646	0.58	0.70	0.40	<0.01	0.01	0.72	Stathmin	gi 9789995	Q545B6	Stmn1	E	30	4	196	17264	5.76
SID1654	0.44	0.90	0.40	<0.01	0.91	<0.01	Stathmin	gi 14625464	Q545B6	Stmn1	E	31	6	65	17000	5.95
SID1595	0.91	2.04	1.86	1.00	0.12	0.04	Stathmin	gi 9789995	Q545B6	Stmn1	E	18	4	187	17264	5.76
SID972	1.14	1.60	1.82	0.25	<0.01	1.00	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	gi 6755682	Q9Z1Z2	Strap	M	63	21	178	38000	4.99
SID1679	0.95	1.37	1.31	1.00	0.02	1.00	Small ubiquitin-related modifier 3 [Precursor]	gi 74211861	Q9Z172	Sumo3	E	22	3	166	12422	5.67
BID1262	1.47	1.19	1.75	0.13	1.00	0.08	Transgelin	gi 6755714	P37804	Tagln	E	22	5	287	22561	8.85
BID1283	0.80	1.51	1.21	1.00	0.90	1.00	transgelin 2	gi 74204347	Q3TIB8	Tagln2	E	60	11	633	22381	8.73
SID1742	0.85	1.17	1.00	0.33	0.43	0.49	Transkription elongation factor B polypeptide 2	gi 13385800	P62869	Tceb2	M	75	13	187	13000	4.87
BID1196	0.75	1.18	0.89	1.00	1.00	1.00	Triosephosphate isomerase	gi 54855	P17751	Tpi1	E	5	1	52	26679	6.9
SID1232	0.88	1.10	0.96	0.16	1.00	<0.01	Tpm3 protein	gi 54912	P21107	Tpm3	M	58	22	256	29000	4.75
SID1386	1.42	1.50	2.13	0.03	0.10	0.38	Translationally-controlled tumor protein	gi 16758734	P63028	Tpt1	M	48	16	118	19000	4.76
SID1387	1.47	1.59	2.35	<0.01	<0.01	0.16	Translationally-controlled tumor protein	gi 16758734	P63028	Tpt1	M	35	8	67	19000	4.76
SID1999	0.74	0.63	0.47	1.00	0.16	0.34	Tubulin beta-5 chain	gi 27465535	P99024	Tubb5	M	43	28	179	50000	4.78

SID999	1.38	2.17	3.00	0.79	0.42	0.17	Tubulin beta-5 chain	gi 7106439	P99024	Tubb5	E	8	3	145	49639	4.78
SID1813	0.78	1.16	0.91	0.13	0.60	0.19	Thioredoxin	gi 14789654	P10639	Txn	E	31	5	257	11668	4.8
SID3502	0.72	1.19	0.85	0.01	0.25	1.00	Thioredoxin domain-containing protein 12 [Precursor]	gi 45239315	Q9CQU0	Txndc12	E	21	3	138	19036	5.14
SID795	1.24	0.90	1.12	0.73	1.00	0.28	Thioredoxin domain-containing protein 5 [Precursor]	gi 19353593	Q91W90	Txndc5	E	19	5	324	36061	5.18
SID934	0.81	0.77	0.63	0.31	0.06	1.00	Thioredoxin-like 2	gi 31981269	Q510V8	Txn12	M	22	5	67	38000	5.42
BID1490	0.73	1.57	1.15	0.06	0.01	1.00	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	gi 4507777	P61079	Ubc2d3	E	14	2	106	16676	7.67
BID1299	0.62	0.99	0.62	<0.01	1.00	0.01	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	gi 4507791	P61082	Ubc2m	E	35	6	249	20887	7.57
SID1719	0.88	1.18	1.04	0.06	0.15	0.58	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	gi 54673547	P61089	Ubc2n	M	48	9	151	17000	6.13
BID1425	0.59	1.50	0.89	0.64	1.00	1.00	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	gi 31543918	Q9D2M8	Ubc2v2	E	17	2	98	16356	7.79
SID427	0.68	1.13	0.77	0.01	0.80	<0.01	Ubiquitin-1	gi 20072434	Q8R317	Ubqln1	M	29	16	105	62000	4.86
SID345	0.74	1.50	1.12	0.01	<0.01	0.66	Ubiquitin-2	gi 48475006	Q9QZM0	Ubqln2	M	17	13	72	67000	5.25
SID1379	0.54	0.59	0.32	<0.01	<0.01	1.00	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	gi 25058057	Q9R0P9	Uchl1	M	71	14	151	25000	5.14
SID3172	0.56	0.60	0.33	<0.01	<0.01	0.01	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	gi 6755929	Q9R0P9	Uchl1	E	13	4	213	24822	5.33
SID1333	1.02	0.88	0.89	1.00	0.55	1.00	Ubiquitin carboxyl-terminal	gi 28913414	Q9JKB1	Uchl3	E	37	9	504	26135	4.96

SID1274	0.88	0.79	0.69	1.00	0.32	1.00	14-3-3 protein gamma	gi 3065929	P61982	Ywhag	M	45	12	114	28000	4.8
---------	------	------	------	------	------	------	----------------------	------------	--------	-------	---	----	----	-----	-------	-----

- a) E: ESI-LC-MS/MS; M: MALDI-TOF-MS.
- b) Identifikation wurde wiederholt falls nur 1 Peptid gefunden wurde.

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle Prof. Dr. Dr. Joachim Klose, der mit unnachahmlicher Energie und Begeisterung neue Sichtweisen für die Proteomanalyse eröffnet hat. Weiterhin möchte ich ihm für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken.

Ich möchte weiterhin allen Arbeitskollegen danken, die mich stets in vielerlei Hinsicht unterstützt haben: Dr. Claus Zabel, Dr. Lei Mao, Dr. Irmgard Römer, Bettina Esch, Yvonne Kläre, Grit Nebrich, Silke Becker, Andrea Koppelstätter, Marion Herrmann, Janine Stuwe, Madeleine Diedrich, Dr. Dijana Sagi, Dr. Angela Kaindl, Oliver Klein und Stefanie Forler.

Zuletzt danke ich meinem Lebenspartner Michael Rohe.

Ich widme diese Arbeit unserem verstorbenen Arbeitskollegen Maik Wacker.

Publikationen:

Hartl D, Rohe M, Zabel C, Mao L, Staufienbiel M and Klose J (2008) Absence of proteome alterations related to development suggests distortions of neuronal plasticity in adolescent APP23 mice. PLoS ONE 3: e2759.

Hartl D*, Irmeler M*, Römer I, Mader MT, Mao L, Zabel C, Hrabe de Angelis M, Beckers J and Klose J (2008) Transcriptome and proteome analysis of early embryonic mouse brain development. Proteomics 8: 1257-1265.

Irmeler M*, **Hartl D***, Schmidt T, Schuchhardt J, Lach C, Meyer HE, Hrabe de Angelis M, Klose J and Beckers J (2008) An approach to handling and interpretation of ambiguous data in transcriptome and proteome comparisons. Proteomics 8: 1165-1169.

Zabel C, Mao L, Woodman B, Rohe M, Kläre Y, Koppelstätter A, Nebrich G, Kapferer A, Forsstrom-Olsson O, Klein O, Grams S, Strand A, Luthi-Carter R, **Hartl D**, Klose J and Bates GP (2008) A large number of protein expression changes in a mouse model for Huntington's disease early in life precede overt disease symptoms. Molecular and Cellular Proteomics, submitted.

Zabel C, Mao L and **Hartl D** (2008) Protein expression overlap – Is it more important than what proteins change in expression? Expert Reviews of Proteomics 5: 187-205.

Mao L, **Hartl D**, Nolden T, Koppelstaetter A, Klose J, Himmelbauer H and Zabel C (2008) Pronounced Alterations of Cellular Metabolism and Structure Due to Hyper- or Hypo-Osmosis. Journal of Proteome Research, in press.

Schuchhardt J, Glintschert A, **Hartl D**, Irmeler M, Beckers J, Stephan C, Marcus K, Klose J, Meyer HE and Malik A (2008) BrainProfileDB - a platform for integration of functional genomics data. Proteomics 8: 1162-1164.

Mao L, Zabel C, Herrmann M, Nolden T, Mertes F, Magnol L, Chabert C, **Hartl D**, Herault Y, Delabar JM, Manke T, Himmelbauer H and Klose J (2007) Proteomic shifts in embryonic stem cells with gene dose

modifications suggest the presence of balancer proteins in protein regulatory networks. PLoS ONE 2: e1218.

*geteilte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den

Daniela Hartl